



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2018

**Daniela Sofia
Cabedal Bispo**

**Estudo da heterogeneidade de tumores mamários:
metabolómica de um modelo animal**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2018

**Daniela Sofia
Cabedal Bispo**

**Estudo da heterogeneidade de tumores mamários:
metabolómica de um modelo animal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica (ramo de Bioquímica Clínica) realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Luisa Alejandra Helguero Shepherd, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

Esta tese foi realizada no âmbito do projeto CICECO - Instituto de Materiais de Aveiro, POCI-01-0145-FEDER-007679 (FCT Ref. UID/CTM/50011/2013), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC e co-financiado pelo FEDER, no âmbito da parceria PT2020. Teve o apoio da Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN), suportada por fundos da FCT. Sendo também financiada por fundos nacionais através da FCT, no âmbito dos projetos UID/BIM/04501/2013 e POCI-01-0145-FEDER-007628, concedidos ao Instituto de Biomedicina de Aveiro.

Dedico esta tese à minha família

o júri

presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor John Griffith Jones

Investigador Principal do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da
Universidade de Coimbra

Professora Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil

Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Univer-
sidade de Aveiro

agradecimentos

A realização desta tese de mestrado só foi possível graças a todos os contributos com que pude contar. Assim, expresso a minha sincera gratidão:

à minha orientadora e co-orientadora, Dra. Ana M. Gil e Dra. Luisa Helguero, respetivamente, pela orientação, apoio, disponibilidade, partilha de conhecimento e rigor científico, pelo incentivo, motivação e paciência;

à Dr. Cláudia Lanari, do Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) de Buenos Aires, que gentilmente cedeu as amostras dos modelos de tumores mamários utilizadas nesta tese;

às colegas do grupo de metabolómica e do departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro, por todo o apoio que me deram e em especial à Rita, com quem pude contar para me ajudar nas etapas iniciais deste trabalho;

à minha família, pelo carinho, apoio, motivação, compreensão e por acreditarem sempre em mim.

palavras-chave:

Cancro da mama (BCa), modelo animal, tumores mamários de murgancho induzidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA), heterogeneidade inter- e intra-tumoral, metabolómica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

resumo:

O cancro da mama (BCa) é a neoplasia mais diagnosticada e a principal causa de morte por cancro nas mulheres. Apesar dos avanços nas metodologias de rastreio, diagnóstico e tratamento, a heterogeneidade inter- e intra-tumoral do BCa está na base dos atuais desafios relativos ao tratamento da doença. Os tumores mamários induzidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) em murganhos têm grande potencial informativo já que apresentam o fenótipo mais comum do BCa humano. Apesar de já terem sido investigados em termos de resposta ao tratamento hormonal, ainda não foram explorados através de estudos metabolómicos. De forma a caracterizar melhor o metabolismo destes tumores, nesta tese analisou-se o metaboloma de extratos aquosos e lipídicos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água. Cada um dos tumores foi seccionado em 8 frações (octantes), sendo 4 destas armazenadas para estudos futuros. Recorrendo à espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN, 500 MHz) de ^1H , aliada a métodos de análise estatística univariada e multivariada, teve-se como objetivos principais determinar as maiores variações metabólicas entre: **a)** tumores de diferentes tipos (tumores P, Q, R e S do tipo 59-2-HI vs. tumores T, U e V do tipo C7-2-HI); **b)** tumores do mesmo tipo; **c)** frações distintas de cada tumor individual. Considerando que, na comparação entre os tipos de tumores, apenas o tumor P se diferenciou dos restantes do seu tipo, foram discutidas razões possíveis para que tal ocorresse e este tumor foi excluído de forma a que apenas se analisassem as diferenças intrínsecas entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI. Relativamente aos tumores C7-2-HI, os tumores 59-2-HI apresentaram níveis significativamente: **a)** mais elevados de vários ácidos orgânicos (piruvato, succinato, citrato e fumarato), compostos de colina (colina e glicerofosfocolina), bases azotadas (uracilo e hipoxantina), nucleósidos (adenosina/inosina), outros metabolitos conhecidos (creatina, esfingomielina, etanolamina, glicerol e glutamato) e compostos desconhecidos; **b)** mais baixos de diversos aminoácidos essenciais (Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Met e Phe) e não essenciais (Ala, Asn, Gln, Pro, Ser e Tyr), poliálcoois (*myo*- e *scyllo*-inositol) e outros metabolitos (fosfocolina, uridina e acetona), incluindo compostos desconhecidos. Entre os tumores 59-2-HI, o tumor P apresentou um perfil médio de metabolitos hidrofílicos que, segundo a literatura, possivelmente poderá refletir um fenótipo mais agressivo e invasivo (principalmente devido ao nível mais elevado de piruvato, lactato e formato e mais baixo de taurina). Comparativamente com os tumores Q, R e S do tipo 59-2-HI, os tumores C7-2-HI mostraram uma heterogeneidade inter-tumoral relativamente inferior. Quanto à heterogeneidade intra-tumoral, constatou-se que o tumor P era o mais variável em termos de metabolitos hidrofílicos, mas o menos variável em metabolitos lipofílicos. Em relação aos tumores Q, R e S do tipo 59-2-HI, os tumores C7-2-HI exibiram mais metabolitos com uma

variabilidade intra-tumoral elevada (e.g. adenosina/inosina e fumarato). Diversos resultados desta tese foram ao encontro da maior agressividade do tipo C7-2-HI, não só por este apresentar algumas características metabólicas comuns às descritas na literatura para tumores mais metastáticos (como o maior nível de aminoácidos, alguns intermediários do ciclo de *Krebs* e acetona, em relação ao tipo 59-2-HI), mas também por geralmente exibir maior heterogeneidade inter- e intra-tumoral do que o tipo 59-2-HI (sem considerar o tumor P). Em suma, como era esperado, a heterogeneidade metabólica entre os tipos tumorais foi mais prevalente do que as diferenças observadas entre tumores do mesmo tipo e a um nível intra-tumoral, sendo que estas últimas também se verificaram e foram significativas. Considerando a heterogeneidade e o perfil metabólico que apresentaram, os tumores analisados nesta tese pareceram também ser razoavelmente representativos do BCa humano.

keywords:

Breast cancer (BCa), animal model, medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced murine mammary carcinomas, inter- and intra-tumour heterogeneity, metabolomics, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

abstract:

Breast cancer (BCa) is the most frequent cancer and the leading cause of cancer death among women. Despite all advances in screening, diagnosis and treatment methodologies, the inter- and intra-tumour heterogeneity in breast cancer is still clinically challenging. The relevance of medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced murine mammary tumours in BCa research lies in the fact that they exhibit the most common phenotype of the human disease. Although the response of this model to hormonal therapy has already been investigated, it has not yet been explored through metabolomics. In this thesis, the metabolome of aqueous and lipid extracts obtained by the methanol-chloroform-water method were analysed to better characterize the metabolism of these tumours. Each of the tumours was sectioned into 8 fractions (octants), 4 of which were stored for future studies. Using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR, 500 MHz), together with univariate and multivariate statistical analysis, we aimed to determine the main metabolic variations between: **a)** tumours of different types (tumours P, Q, R and S of the type 59-2-HI vs. tumours T, U and V of the type C7-2-HI); **b)** tumours of the same type; **c)** different fractions of each individual tumour. Considering that, in the comparison between tumour types, tumour P was the only one that differed from the others of its type, the possible reasons for such result were discussed and this tumour was excluded in further analysis of intrinsic differences between tumour types. With respect to C7-2-HI tumours, 59-2-HI tumours showed significantly: **a)** higher levels of some organic acids (pyruvate, succinate, citrate and fumarate), choline containing compounds (choline and glycerophosphocholine), nitrogenous bases (uracil and hypoxanthine), nucleosides (adenosine / inosine), other known metabolites (creatine, sphingomyelin, ethanolamine, glycerol and glutamate) and unknown compounds; **b)** lower levels of several essential (Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Met and Phe) and nonessential amino acids (Ala, Asn, Gln, Pro, Ser and Tyr), polyalcohols (*myo*- and *scyllo*-inositol), other metabolites (phosphocholine, uridine and acetone) including unknown compounds. Among 59-2-HI tumours, tumour P showed a polar metabolome that, according to the literature, may reflect a more aggressive and invasive phenotype (mainly due to the higher level of pyruvate, lactate and format and lower level of taurine). In comparison to C7-2-HI tumours, 59-2-HI tumours (Q, R, and S) were shown to have a relatively lower inter-tumour heterogeneity. Regarding intra-tumour heterogeneity, tumour P was the most variable in terms of hydrophilic metabolites, but the least variable in terms of lipophilic metabolites. When compared to 59-2-HI tumours Q, R and S, C7-2-HI tumours revealed more metabolites with high intra-tumour variability (e.g. adenosine/inosine and fumarate). Several results of this thesis were in agreement with the higher aggressiveness of the type C7-2-HI, not only because it presents some metabolic characteristics common to those described in literature for more metastatic tumours (such as higher levels of amino acids, some *Krebs* cycle intermediates and acetone, compared to 59-2-HI tumours), but also because it exhibits a generally

greater inter- and intra-tumour heterogeneity than the 59-2-HI type (excluding tumour P).

In summary, as expected, metabolic heterogeneity between tumour types was larger than the differences observed within tumours of the same type and at the intra-tumoral level, although the latter were also measurable and significant. The tumours analysed in this thesis showed a metabolic heterogeneity and profile considered reasonably representative of the human BCa.

Índice

Abreviaturas	iii
1. Introdução	1
1.1. Cancro da mama (BCa)	1
1.1.1. Carcinogénese mamária	1
1.1.2. Função dos recetores hormonais (ER e PR) e de HER2 no cancro da mama	2
1.1.3. Metabolismo associado ao cancro da mama	3
1.2. Heterogeneidade do cancro da mama	3
1.2.1. Heterogeneidade como ferramenta de classificação, diagnóstico e tratamento do BCa.....	5
1.2.1.1 Classificação do cancro da mama	5
1.2.1.2. Rastreio e diagnóstico do cancro da mama	7
1.2.1.3. Tratamento do cancro da mama.....	8
1.2.2. Causas e consequências da heterogeneidade intra-tumoral	11
1.3. Modelos animais no estudo do BCa	12
1.3.1. Sumário de modelos mais usados no BCa	13
1.3.2. Modelo de BCa induzido por acetato de medroxiprogesterona (MPA).....	14
1.4. As ciências <i>ómicas</i>	15
1.4.1 Conceitos gerais	15
1.4.2. Metabolómica do cancro da mama	15
1.4.2.1. Estratégias analíticas	15
1.4.2.2. Estado da arte – Estudos metabolómicos em tecido tumoral mamário.....	20
1.5. Objetivos da presente tese	29
2. Materiais e Métodos	30
2.1. Amostras de tumores mamários em estudo	30
2.2. Preparação de extratos de tumores	31
2.3. Análise de extratos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	32
2.3.1. Aquisição dos espectros de RMN	32
2.3.2. Processamento, alinhamento e normalização dos espectros	33
2.3.3. Identificação dos sinais dos espectros de RMN	34
2.4. Análise estatística	34
2.4. Avaliação do conteúdo proteico de tumores do tipo 59-2-HI	36
2.4.1. Extração e quantificação de proteínas totais	36
2.4.2. Western Blot.....	36
3. Resultados e discussão	37
3.1. Identificação de espectros de RMN de ^1H de extratos de tumores mamários induzidos por MPA	37

3.1.1. Análise de extratos aquosos	37
3.1.2. Análise de extratos lipídicos	43
3.2. Avaliação do perfil metabólico entre tumores (heterogeneidade inter-tumoral).....	47
3.2.1. Comparação entre diferentes tipos de tumores: 59-2-HI e C7-2-HI	47
3.2.1.1. Análise de extratos aquosos	47
3.2.1.2. Análise de extratos lipídicos.....	55
3.2.1.3. Interpretação bioquímica.....	59
3.2.2. Comparação entre tumores do tipo 59-2-HI	69
3.2.2.1. Análise de extratos aquosos	69
3.2.2.2. Análise de extratos lipídicos.....	73
3.2.2.3. Interpretação bioquímica.....	76
3.2.3. Comparação entre tumores do tipo C7-2-HI	80
3.2.3.1. Análise de extratos aquosos	80
3.2.3.2. Análise de extratos lipídicos.....	83
3.2.3.3. Interpretação bioquímica.....	84
3.3. Resultados preliminares da avaliação da heterogeneidade metabólica intra-tumoral.....	84
3.4. Análise da expressão das isoformas do recetor de progesterona (PR _A e PR _B)	89
4. Conclusão e perspectivas futuras	91

Abreviaturas

2D	Bidimensional (do inglês “ <u>2-Dimensional</u> ”)
4-HT	<u>4-Hidroxi</u> Tamoxifeno
AF	Região da função de ativação (do inglês “ <u>A</u> ctivation <u>F</u> unction”)
AKT	Proteína cinase B (do inglês “ <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>B</u> ”)
AXP	Adenosina-Xfosfato (do inglês “ <u>A</u> denosine <u>X</u> Phosphate”), onde X=M (mono-), D (di-) ou T (tri-)
BCa	Cancro da mama (do inglês “ <u>B</u> reast <u>C</u> ancer”)
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês “ <u>B</u> ranch <u>e</u> d- <u>C</u> hain <u>A</u> mino <u>A</u> cids”)
BCL-XL	Do inglês “ <u>B</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma- <u>e</u> <u>X</u> tra <u>L</u> arge”
br	Largo (do inglês “ <u>b</u> road”)
BRCA	Genes do cancro da mama (do inglês “ <u>B</u> Reast <u>C</u> ancer”)
CAA	Adipócito associados ao cancro (do inglês “ <u>C</u> ancer- <u>A</u> ssociated <u>A</u> dipoc <u>y</u> tes”)
CAF	Fibroblasto associados ao cancro (do inglês “ <u>C</u> ancer- <u>A</u> ssociated <u>F</u> ibroblast”)
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica (do inglês “ <u>c</u> yclic <u>A</u> denosine <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate”)
Cav	<u>C</u> aveolina
CCM	Metabolito que contém colina (do inglês “ <u>C</u> holine <u>C</u> ontaining <u>M</u> etabolites”)
cDNA	DNA complementar (do inglês “ <u>c</u> omplementary <u>D</u> NA”)
CDX	Xenógrafo derivado de células (do inglês “ <u>C</u> ell- <u>D</u> erived <u>X</u> enograft”)
CE	Conformidade europeia (do francês “ <u>C</u> onformité <u>E</u> uropéenne”)
CK	Citoqueratina (do inglês “ <u>C</u> yto <u>K</u> eratin”)
CoA	<u>C</u> o- <u>A</u> tivador
CoR	<u>C</u> o- <u>R</u> epressor
CSC	Célula estaminal cancerígena (do inglês “ <u>C</u> ancer <u>S</u> tem <u>C</u> ell”)
CYP2D6	Do inglês “ <u>C</u> ytochrome <u>P</u> 450 family <u>2</u> subfamily <u>D</u> member <u>6</u> ”
d	<u>d</u> uplete
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (do inglês “ <u>D</u> uctal <u>C</u> arcinoma <u>I</u> n <u>S</u> itu”)
dd	<u>d</u> uplo <u>d</u> uplete
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês “ <u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid”)
dt	<u>d</u> uplo <u>t</u> ripleto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “ <u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etra <u>A</u> cetic acid”)
ER	Recetor de estrogénio (do inglês “ <u>E</u> strogen <u>R</u> eceptor”)
ES	Do inglês “ <u>E</u> ffect <u>S</u> ize”
FA	Ácido gordo (do inglês “ <u>F</u> atty <u>A</u> cid”)
FDA	Agência americana para a segurança alimentar e dos medicamentos (do inglês “ <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> ministration”)
FH	<u>F</u> umarato <u>H</u> idratase

FID	Do inglês “ <i>Free Induction Decay</i> ”
GC-TOF-MS	Cromatografia gasosa seguida de MS com analisador de tempo de voo (do inglês “ <i>Gas Chromatography - Time Of Flight - MS</i> ”)
GEMM	Modelo de murganho geneticamente modificado (do inglês “ <i>Genetically Engineered Mouse Model</i> ”)
GLUT1	Transportador de glucose 1 (do inglês “ <i>GLUcose TTransporter 1</i> ”)
GPC	Glicerofosfolina (do inglês “ <i>GlyceroPhosphoCholine</i> ”)
HD	Dependente de hormonas (do inglês “ <i>Hormone Dependent</i> ”)
HER	Recetor do fator de crescimento epidermal (do inglês “ <i>Human Epidermal growth factor Receptor</i> ”)
HI	Independente de hormonas (do inglês “ <i>Hormone Independent</i> ”)
HIF	Fator induzido por hipóxia (do inglês “ <i>Hypoxia Inducible Factor</i> ”)
HRMAS	Elevada resolução com rotação segundo o ângulo mágico (do inglês “ <i>High-Resolution Magic Angle Spinning</i> ”)
IBYME	Do espanhol “ <i>Instituto de Biología Y Medicina Experimental</i> ”
IDC	Carcinoma ductal invasivo (do inglês “ <i>Invasive Ductal Carcinoma</i> ”)
IHC	Imunohistoquímica (do inglês “ <i>ImmunoHistoChemistry</i> ”)
KLF5	Do inglês “ <i>Kruppel Like Factor 5</i> ”
LDH	Lactato desidrogenase (do inglês “ <i>Lactate DeHydrogenase</i> ”)
LV	Variável latente (do inglês “ <i>Latent Variable</i> ”)
m	<u>m</u> últiplo
MCF-7	Do inglês “ <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> ”
MCT	Transportador de monocarboxilato (do inglês “ <i>MonoCarboxylate Transporter</i> ”)
MF	<u>Mi</u> Fepristona
miRNA	Micro ácido ribonucleico (do inglês “ <i>micro-RiboNucleic Acid</i> ”)
MPA	Acetato de medroxiprogesterona (do inglês “ <i>MedroxyProgesterone Acetate</i> ”)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês “ <i>messenger RiboNucleic Acid</i> ”)
MS	Espetrometria de massa (do inglês “ <i>Mass Spectrometry</i> ”)
mTOR	Alvo de rapamicina em células de mamífero (do inglês “ <i>mammalian Target Of Rapamycin</i> ”)
MUFA	Ácido gordo de cadeia monoinsaturada (do inglês “ <i>MonoUnsaturated Fatty Acid</i> ”)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês “ <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ”)
PAM50	Análise de previsão de <i>microarray</i> 50 (do inglês “ <i>Prediction Analysis of Microarray 50</i> ”)
PC	Fosfolina (do inglês “ <i>PhosphoCholine</i> ”)
PCA	Análise do componente principal (do inglês “ <i>Principal Component Analysis</i> ”)
PCAc	Ácido perclórico (do inglês “ <i>PerChloric Acid</i> ”),
PDX	Xenógrafo derivado do paciente (do inglês “ <i>Patient-Derived Xenograft</i> ”)
PE	Fosfoetanolamina (do inglês “ <i>PhosphoEthanolamine</i> ”)
Pg	<u>P</u> rogesterona

PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês “ <i>PhosphatIdylinositol 3-Kinase</i> ”)
PLS-DA	Análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (do inglês “ <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> ”)
PME	Fosfomonoéster (do inglês “ <i>PhosphoMonoEster</i> ”)
PR	Recetor de progesterona (do inglês “ <i>Progesterone Receptor</i> ”)
PtdCho	Fosfatidilcolina (do inglês “ <i>PhosphatidylCholine</i> ”)
q	quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês “ <i>Relative Standard Deviation</i> ”)
RSPA	Do inglês “ <i>Recursive Segment-wise Peak Alignment</i> ”
s	singleto
SCID	Imunodeficiência combinada severa (do inglês “ <i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i> ”)
SDH	Succinato desidrogenase (do inglês “ <i>Succinate DeHydrogenase</i> ”)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês “ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ”)
t	tripleto
TAM	TAMoxifeno
TBST	Tampão salino de Tris com Tween 20 (do inglês “ <i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i> ”)
TGFB1	Fator de crescimento transformante β1 (do inglês “ <i>Transforming Growth Factor β1</i> ”)
TMS	TetraMetilSilano
TOCSY	Espetroscopia de correlação total (do inglês “ <i>TOtal Correlation SpectroscopY</i> ”)
TSP	Ácido 3-TrimetilSilil Propiónico
U	Do inglês “ <i>Unsigned</i> ”
UPase	uridina fosforilase (do inglês “ <i>Uridine Phosphorylase</i> ”)
VIP	Importância da variável na projecção (do inglês “ <i>Variable Importance in Projection</i> ”)

1. Introdução

1.1. Cancro da mama (BCa)

O cancro da mama (BCa) é a neoplasia mais diagnosticada e a principal causa de morte por cancro nas mulheres [1,2]. Deste modo, existe grande interesse por parte da comunidade científica não só em compreender a génese e progressão dos tumores mamários, mas também em determinar as melhores abordagens de rastreio, diagnóstico e tratamento [3]. Especificamente em Portugal estima-se que em 2018 as taxas de incidência e mortalidade associadas ao BCa em mulheres sejam, respetivamente, 7% e 1% [4].

1.1.1. Carcinogénese mamária

Ainda não existe um consenso acerca da génese do BCa, sendo que a principal incerteza reside no tipo de célula que origina o tumor. Porém, aceita-se que o carcinoma mamário tem origem num processo complexo, onde alterações genéticas/epigenéticas levam à ativação de proto-oncogenes e/ou desativação de genes supressores de tumores [5]. Tal como ocorre noutros cancros, também no BCa a conversão de células normais em cancerígenas depende da aquisição de capacidades funcionais que lhes confirmam vantagens de sobrevivência, proliferação e disseminação (Figura 1).

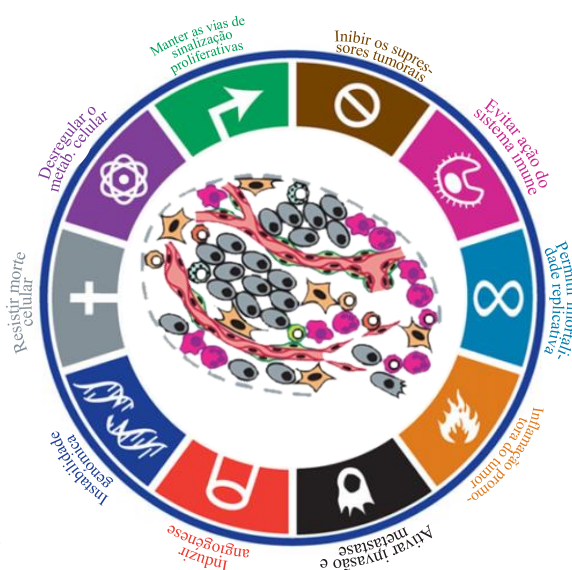


Figura 1 – Representação das capacidades funcionais adquiridas por uma célula normal e que permitem a sua conversão em célula cancerígena. (Adaptado da referência [5])

Atualmente, os modelos explicativos da origem do cancro mais aceites (não mutuamente exclusivos) são o da evolução clonal e o das células estaminais cancerígenas (CSCs) [6]. O modelo da evolução clonal apoia que o fenótipo das células tumorais não é estático, sendo definido pela vantagem adaptativa e dependendo de vários fatores (como o tipo de célula de origem). Enquanto que neste modelo todas as células cancerígenas se auto-renovam e influenciam a progressão tumoral e a resistência a fármacos, no modelo das CSCs estas características só estão presentes nas CSCs.

O BCa considera-se hereditário ou esporádico consoante a presença ou ausência de, pelo menos, uma mutação germinativa que predisponha para o seu desenvolvimento. Cerca de 89% dos casos são esporádicos [7], sendo causados por mutações somáticas e instabilidade genómica [5]. Nos casos hereditários, embora existam vários genes sensíveis a mutações germinativas que aumentam o risco de ter BCa [8], a maioria relaciona-se com deleções ao nível dos genes da família *BRCA* [7]. Note-se que, além da predisposição genética, existem outros fatores de risco (como a idade e o estilo de vida) que aumentam a probabilidade de ocorrer BCa [9].

1.1.2. Função dos recetores hormonais (ER e PR) e de HER2 no cancro da mama

Uma das primeiras alterações oncogénicas que ocorre na maioria dos tumores mamários é o aumento da expressão de recetores de estrogénio α (ER α) e de Pg (PR) [10]. Estes recetores hormonais são elementos chave na proliferação, sobrevivência e migração das células tumorais. Apesar de ser menos comumente sobre-expresso, o recetor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2) representa um componente essencial para a génese e progressão de alguns casos de BCa [11]. Além disso, também existem carcinomas mamários que não expressam nenhum destes recetores (designando-se triplos negativos), cuja génese e progressão dependem de mecanismos alternativos [12,13].

A ativação de ER α desencadeia eventos promotores do BCa. Este recetor de hormonas esteroides possui 6 domínios (A-F), destacando-se os domínios amino-terminais A/B que contêm a região 1 com função de ativação (AF1; regulada por fosforilação), o domínio C (local de ligação ao DNA) e o domínio E que engloba uma 2ª região com função de ativação (AF2; local de ligação do estrogénio) [14,15]. O ER α pode ser ativado pela ligação de estrogénio a AF2 ou pela fosforilação de AF1 (mediante vias dependentes de fatores de crescimento) [16]. Daqui resulta uma alteração conformacional que induz a dimerização de ER α e a sua ligação a co-ativadores (CoAs), que recrutam as histonas acetiltransferases, responsáveis pela descondensação da cromatina [17]. Em seguida, os dímeros de ER α favorecem a transcrição de genes direta (ligando-se a elementos de resposta ao estrogénio do DNA) ou indiretamente (recrutando fatores de transcrição). Entre os genes alvo de ER α encontra-se aquele que codifica o PR, sendo que a maioria dos tumores sobre-expressa ER α e PR em simultâneo [18,19]. Possuindo o mesmo mecanismo de ação de ER α , a ativação das isoformas A e B dos PRs pela Pg leva à alteração da expressão de genes alvo envolvidos no BCa [20]. Apesar dos PRs servirem normalmente como marcadores da função de ER α , comprovou-se que a relação entre estes recetores é bastante complexa. Recentemente, sugeriu-se que a ativação de PR influencia o local onde o ER α se liga ao DNA, alterando a expressão dos seus genes alvo [21]. Geralmente, os genes alvo do ER α e do PR promovem a divisão celular e inibem a apoptose, favorecendo o crescimento tumoral. Quando inativados por união a antagonistas, tanto o ER α (presente em 70-80% dos tumores mamários invasivos [19]), como o PR, se ligam a co-repressores (CoRs) que recrutam histona desacetilases, favorecendo a condensação da cromatina e o silenciamento de genes alvo [14,15].

Os níveis de HER2 estão elevados em 20-30% dos carcinomas mamários, sendo que a sua dimerização (homo- ou heterodimerização com outros recetores tirosina cinases) ativa vias de sinalização promotoras da proliferação, crescimento e sobrevivência do BCa [11]. Nestas vias estão envolvidos fatores de crescimento que interagem com ER α , aumentando a ativação dos ER α existentes (fosforilam AF1) e diminuindo a expressão do ER α (através de um processo reversível) [22–24].

1.1.3. Metabolismo associado ao cancro da mama

A conversão de células normais em tumorais depende da rápida geração de energia, do aumento da síntese de macromoléculas e da manutenção do balanço oxidação-redução [25,26]. Estas ações podem ter origem em diversos mecanismos que levam à reprogramação metabólica responsável pela sobrevivência, crescimento e proliferação tumoral. O estudo destas alterações metabólicas pode ser realizado em vários tipos de amostras e recorrendo a diferentes técnicas (este assunto será explorado em detalhe no subcapítulo 1.4.2.1.).

Tal como ocorre noutros cancros, o surgimento de BCa associa-se à reprogramação do metabolismo de glucose, aminoácidos, lípidos e glutatona [27]. Na Figura 2A mostra-se como os metabolismos da glucose e da glutamina estão conectados, permitindo a síntese de moléculas essenciais para a sobrevivência celular. Na presença de O₂, as células diferenciadas tendem a oxidar o piruvato glicolítico no ciclo de *Krebs*, resultando substratos reduzidos que são oxidados na cadeia transportadora de eletrões para gerar ATP (adenosina-trifosfato). Já as células tumorais produzem altos níveis de lactato, independentemente do teor de O₂ (efeito de *Warburg*). Apesar deste mecanismo ser menos eficiente na obtenção de ATP, pensa-se que a abundância de lactato é benéfica para as células tumorais por torná-las mais destrutivas para o tecido envolvente e mais resistentes ao sistema imunitário [28]. Além disso, a proliferação tumoral é favorecida pelo aumento do *uptake* e da síntese de aminoácidos [29], já que estes podem servir de fontes de energia, carbono e nitrogénio, sendo que alguns tumores se tornam altamente dependentes da sua presença [30]. O elevado metabolismo lipídico também é característico dos tumores, já que a rápida proliferação tumoral leva a rearranjos membranares constantes, elevando o metabolismo da fosfatidilcolina (PtdCho – um dos principais fosfolípidos da membrana celular) e gerando metabolitos que contêm colina (CCMs), como ilustra a Figura 2B [31]. Também ocorre a alteração do metabolismo da glutatona, correspondendo maiores níveis da sua forma reduzida à maior resistência ao *stress* oxidativo [32]. Muitas das alterações metabólicas referidas podem ser causadas por mutações genéticas e/ou pela alteração da expressão/atividade proteica (especialmente de enzimas e transportadores) [33].

1.2. Heterogeneidade do cancro da mama

Em oncologia, a variabilidade que existe nos tumores a nível celular, molecular e estrutural (heterogeneidade tumoral) tem-se verificado não só entre carcinomas mamários de diferentes pacientes (heterogeneidade inter-tumoral), como também dentro de cada tumor (heterogeneidade intra-tumoral) [34]. Apesar da heterogeneidade intra-tumoral se referir normalmente à variabilidade entre regiões da mesma lesão tumoral (o que também pode variar ao longo do tempo), alguns autores consideram que este conceito também inclui a variabilidade entre o tumor primário e as suas metástases e entre as

diferentes metástases. A heterogeneidade não é exclusiva das células tumorais epiteliais (geralmente designadas simplesmente por “células tumorais”), observando-se também no estroma tumoral, que pode incluir a matriz extracelular, fibroblastos, células do sistema imunitário, adipócitos e vasos sanguíneos [35].

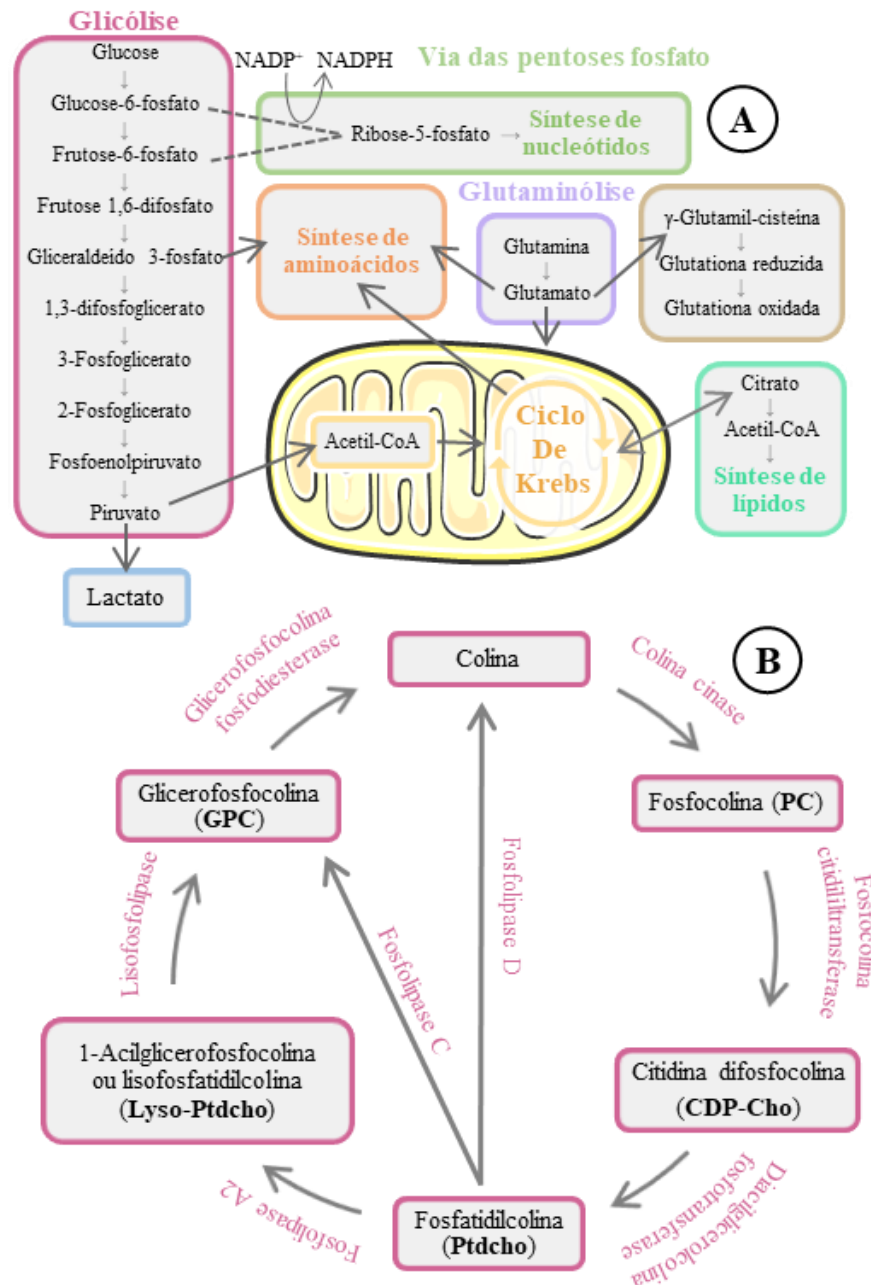


Figura 2 – Ilustração simplificada de algumas vias metabólicas essenciais que são reprogramadas aquando do surgimento de cancro. **A)** Interligação dos metabolismos da glicose e da glutamina que permitem a síntese molecular. **B)** Metabolismo da fosfatidilcolina que permite a geração de metabolitos derivados de colina.

1.2.1. Heterogeneidade como ferramenta de classificação, diagnóstico e tratamento do BCa

Os carcinomas mamários não apresentam todos o mesmo grau de heterogeneidade entre si, possibilitando o agrupamento dos tumores em subtipos consoante a sua semelhança. Apesar de ainda não haver um consenso, pensa-se que existência de diferentes subtipos tumorais pode dever-se ao tipo de célula que originou o tumor e/ou a certos eventos genéticos/epigenéticos [6]. A estratificação do BCa é extremamente relevante em contexto clínico, já que fenótipos tumorais distintos se associaram a diferentes prognósticos, respostas ao tratamento e taxas de sobrevivência [36,37].

1.2.1.1 Classificação do cancro da mama

Dado que a heterogeneidade inter-tumoral é evidente a vários níveis, têm surgido cada vez mais sistemas de classificação do BCa. Em seguida são destacados três sistemas de classificação comumente utilizados baseados na diversidade histológica, imunohistoquímica (IHC) e molecular que se verifica nos tumores mamários.

Classificação histológica do cancro da mama

A análise histológica de tumores mamários permite a sua classificação em subtipos (consoante as suas características morfológicas) e a atribuição de estádios com base no grau de diferenciação (formação tubular e pleomorfismo nuclear) e na atividade proliferativa (índice mitótico) [38]. Para a classificação histológica do BCa tem-se em consideração se existe ou não a invasão do tecido adjacente, podendo os carcinomas ser invasivos (o mais frequente) ou *in situ* [39,40]. Conforme as suas características citológicas e o seu padrão de crescimento, cada tumor invasivo ou *in situ* pode ser dividido em subtipos histológicos mais específicos. Entre estes, os carcinomas ductais *in situ* (DCIS) e invasivos (IDC) são os subtipos mais comuns. Contudo, a divisão em subtipos histológicos não é estática pois alguns carcinomas *in situ* evoluem para invasivos [41]. Uma das teorias propostas para esta evolução aponta para que a acumulação de alterações genéticas/epigenéticas esteja na origem da capacidade de invasão.

A análise histológica mostra-se benéfica e necessária no contexto clínico. Os diferentes subtipos histológicos estão claramente associados a características clínicas (como tamanho do tumor e presença de nódulos) e prognósticos distintos [42,43]. Ainda que a divisão em grupos histológicos não permita prever a resposta a todas as terapias disponíveis, pode auxiliar na decisão de certos tratamentos (tipo de cirurgia e quimioterapia) [44]. Já o estágio histológico está associado à agressividade do tumor e fornece informação adicional acerca do prognóstico do paciente [45].

Classificação imunohistoquímica do cancro da mama

A análise IHC recorre a anticorpos para a deteção de marcadores moleculares de interesse. No

contexto do BCa, a classificação em subtipos IHCs tem em consideração a presença (+) ou ausência (-) de ER α , de PR e de HER2. Existem limites mínimos bem estabelecidos para considerar positiva a presença dos recetores hormonais (>1% das células tumorais) e do HER2 (>30% das células tumorais) [46,47]. Apesar de se considerarem 8 subtipos IHCs possíveis (ER \pm /PR \pm /HER2 \pm), aqueles em que o ER e o PR não estão simultaneamente presentes (ou ausentes) são mais raros [48].

A atribuição de subtipos IHCs fornece informações clínicas que completam a classificação histológica. Comprovou-se que subtipos IHCs distintos se associam a diferentes taxas de sobrevivência, sendo que o fenótipo ER $^+$ /PR $^+$ /HER2 $^-$ tem os melhores resultados [48]. Além disso, a incidência de cada subtipo IHC varia com as características do tumor (tamanho e estágio histológico) e do paciente (idade e etnicidade). Como geralmente permite antecipar a resposta à terapia endócrina, a classificação IHC do BCa é essencial na seleção do tratamento (mencionado com detalhe adiante) [49]. No entanto, importa mencionar que pode surgir a perda da expressão dos recetores hormonais decorrente de certas terapias [50], ou haver discrepâncias entre os tumores primários e metástases [51].

Classificação molecular intrínseca do cancro da mama

A classificação molecular intrínseca do BCa tira partido da grande diversidade de perfis transcricptómicos que existe. No ano de 2000, Perou *et. al* [52] agruparam, pela primeira vez, tumores mamários em 4 subtipos moleculares intrínsecos com base nos seus padrões de expressão genética. Atualmente, reconhece-se a existência de, pelo menos, 6 subtipos moleculares: luminal A (~50-60%), luminal B (~10-20%), HER2 (~15-20%), *basal-like* (~10-20%), *normal-like* (~5-10%) e *low-claudin* (~12-14%) [53,54]. Ainda assim, tem-se explorado a possibilidade de existirem outros subtipos moleculares (como o *luminal-like* e o luminal C), fazendo com que esta classificação esteja ainda em desenvolvimento [55]. Além disso, foi sugerido que os tumores luminais representem apenas diferentes etapas de diferenciação/proliferação e não subtipos distintos [56].

Inicialmente, os subtipos moleculares do BCa identificaram-se com *microarrays* de DNA complementar (cDNA) e com programas computacionais que analisavam a expressão de centenas a milhares de genes, agrupando os tumores com perfis idênticos [52,53]. Atualmente, estão disponíveis testes multigenéticos que permitem a rápida classificação molecular, já que analisam um menor número de genes [57]. Destaca-se o *Prosigna*TM (aprovado pela FDA e com marcação CE) que classifica os tumores em 5 subtipos moleculares e se baseia num algoritmo de classificação de 50 genes (PAM50) [58]. Durante o desenvolvimento do PAM50, entre os ~1.900 genes analisados foi selecionado o número de genes mínimo que conferia uma exatidão razoável (neste caso, 93%) [59,60].

Comparativamente com os métodos de classificação já referidos, a classificação molecular permite uma compreensão mais vasta da biologia do BCa [59]. A divisão em subtipos moleculares distintos também fornece informações acerca do prognóstico e da resposta a diferentes terapias. Assim, além

dos testes multigenéticos de identificação já referidos, também se desenvolveram testes que avaliam especificamente o prognóstico (*Endopredict*[®]) e o benefício de determinadas terapias (*Oncotype DX*[®]) com base nos padrões de expressão genética [57].

1.2.1.2. Rastreio e diagnóstico do cancro da mama

Para melhorar a sobrevivência das mulheres com tumores mamários, aposta-se na sua deteção precoce com implementação de medidas de rastreio e diagnóstico [2]. Tal contribuiu para que a morte por BCa estabilizasse ou diminuísse, apesar da sua crescente incidência na Europa [1]. Entre 2003 e 2013, Portugal foi o país europeu com a 2^a menor taxa de mortalidade por BCa.

Segundo as *guidelines* europeias que asseguram a qualidade de rastreio e diagnóstico do BCa [3], o rastreio destina-se à identificação da doença em mulheres ainda assintomáticas, de modo a diminuir a mortalidade. Neste contexto importa referir que a deteção de microtumores em estádios muito iniciais também pode promover o sobrediagnóstico. Apesar deste procedimento englobar vários métodos (como exame clínico e auto-exame da mama), só a mamografia se demonstrou eficaz [61]. Após a suspeita inicial de BCa, o diagnóstico engloba 4 etapas essenciais: exame clínico (tem em conta a presença de nódulos palpáveis e alterações cutâneas), técnicas de imagiologia (por exemplo, através de mamografia, ecografia ou imagem por ressonância magnética), realização de biópsia (através de punção aspirativa por agulha fina ou por agulha grossa) e análise histológica/IHC [2,38].

Apesar de ainda não ser implementada na rotina clínica, é reconhecido o potencial da classificação molecular do BCa. De facto, é aconselhado o recurso a análises multigenéticas quando nenhum dos outros critérios de diagnóstico permite decidir a terapia adequada [62]. Mas, na maioria dos casos, os testes moleculares disponíveis não oferecem informações adicionais que justifiquem o seu uso [63]. Ainda assim, na clínica é frequente atribuir os termos dos subtipos moleculares mais prováveis, por aproximação direta da classificação IHC. Inicialmente, teve-se em conta a presença de ER, PR e HER2, contudo existiam vários subtipos moleculares com probabilidades significativas para os mesmos subtipos IHCs (Tabela 1) [64]. Estudos mais recentes indicaram que a adição de outros marcadores IHCs melhoravam esta aproximação (Tabela 2). Sugeriu-se que tumores luminais A e B com igual classificação IHC (ER⁺e/ou PR⁺, HER2⁻) podiam distinguir-se com base na percentagem de núcleos tumorais que apresentassem Ki-67 (marcador de divisão celular) [65]. De facto, um *cut-off* de 14% para o índice Ki-67 permitiu a identificação dos subtipos luminais A e B com uma especificidade de 78% e uma sensibilidade de 77%. Além disso, constatou-se que a presença de citoqueratinas 5 e 6 (CK 5/6) e/ou de HER1 em tumores ER⁻/PR⁻/HER2⁻ permitiam identificar o subtipo *basal-like* com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 76% [66]. Porém, normalmente só se reconhece o potencial dos marcadores ER, PR, HER2 e Ki-67 na determinação do subtipo molecular, não se apoiando a identificação IHC de CK 5/6, nem de HER1 no contexto clínico [67].

Tabela 1 – Correspondência entre os subtipos moleculares do BCa e os subtipos IHC mais comuns. Os dados apresentados foram calculados com base nos resultados fornecidos na tabela suplementar 3 do artigo [64].

Subtipos moleculares / Subtipos IHCs	Luminal A	Luminal B	HER2	Basal-like	Normal-like	Low-claudin
ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁻	48.8%	26.8%	6.3%	3.4%	7.8%	6.8%
ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁺	29.4%	14.7%	32.4%	-	23.5%	-
ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁺	2.9%	-	68.6%	17.1%	5.7%	5.7%
ER ⁻ /PR ⁻ /HER2 ⁻	-	-	9.1%	60.9%	5.5%	24.5%

Tabela 2 – Atribuição de subtipos moleculares a tumores mamários com base no seu perfil IHC.

Subtipo molecular	Perfil IHC
Luminal A [65]	ER ⁺ e/ou PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki67<14%
Luminal B [65]	ER ⁺ e/ou PR ⁺ , HER2 ⁺ ER ⁺ e/ou PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki67>14%
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺
Basal-like [66]	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ , CK 5/6 ⁺ e/ou HER1 ⁺

1.2.1.3. Tratamento do cancro da mama

Além das medidas de rastreio e diagnóstico, a aplicação da terapia adequada contribuiu para o decréscimo da taxa de mortalidade por BCa na Europa [1]. Segundo a Sociedade Europeia de Oncologia Médica, a escolha do tratamento deve basear-se na biologia (presença de biomarcadores e expressão genética) e características clinico-patológicas do tumor (como o tamanho, a localização do tumor primário, o número de lesões e o número de nódulos linfáticos), bem como no paciente em questão (idade, saúde, preferência) [49]. Há tratamentos locais (como cirurgia e radioterapia) e sistêmicos (como quimioterapia, terapia endócrina e terapia alvo não endócrina). Na Tabela 3 apresentam-se as terapias sistêmicas mais adequadas para cada subtipo IHC de BCa [67].

Tabela 3 – Tratamento sistémico recomendado para cada subtipo IHC de cancro da mama. (Adaptado da referência [67])

Perfil IHC	Terapia sistémica recomendada
ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki67<14% (“Luminal A”)	Apenas terapia endócrina (raramente requer quimioterapia)
ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki67>14% (“Luminal B”)	Terapia endócrina, podendo requerer quimioterapia
ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁺ (“Luminal B”)	Quimioterapia, anti-HER2 e terapia endócrina
ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ (“HER2”)	Quimioterapia e anti-HER2
ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ (“Triplo-negativo”)	Quimioterapia

Como 70-80% dos carcinomas mamários invasivos expressam ER α , na maioria dos casos aplica-se a terapia endócrina (em combinação ou não com outros tratamentos) [19]. Esta pode consistir na

administração de agentes anti-estrogénicos, destacando-se os moduladores seletivos do ER (como o tamoxifeno ou TAM), os desreguladores seletivos de ER (como fulvestrante) ou inibidores de aromatase (inibem a produção periferal de estrogénio). Apesar de alguns agentes anti-estrogénicos terem eficácia igual ou superior ao TAM [68], este ainda é o fármaco de eleição no tratamento de tumores ER⁺ [49]. Ainda assim, é importante referir que o tratamento em mulheres pré- e pós-menopausa pode diferir. Enquanto que antes da menopausa o uso de TAM é a terapia padrão, após a menopausa pode ser necessário administrar inibidores de aromatase além, ou em vez, do TAM.

Tratamento do cancro da mama com tamoxifeno

Dependendo do órgão em que atua, o TAM pode funcionar como agonista ou antagonista de estrogénio, já que pode recrutar CoAs ou CoRs de ER α . Portanto, apesar dos seus efeitos adversos serem relativamente bem tolerados (como náuseas e dores ósseas), o facto deste fármaco ter um efeito estrogénico em certos tecidos pode causar consequências mais severas (como tromboembolismo ou cancro endometrial) [69–71]. Especificamente no epitélio mamário, tende a funcionar como anti-estrogénico por inibir a ativação de AF2, o principal responsável pela atividade de ER α neste local [17]. Apesar de algumas vezes ser considerado uma pró-droga, o facto de o TAM ser metabolizado por isoformas do citocromo P450 é uma vantagem e não um requisito para a sua ação anti-estrogénica. Os seus principais metabolitos são o 4-hidroxitamoxifeno (4-HT; metabolito primário) e endoxifeno (metabolito secundário formado a partir de *N*-desmetiltamoxifeno por ação de variantes de CYP2D6) [72]. Embora tenham atividade anti-estrogénica semelhante, o endoxifeno é mais abundante no plasma, sendo responsável pela maioria da atividade anti-estrogénica [73,74].

Apesar do TAM ser o fármaco de eleição na terapia de carcinomas mamários ER⁺, nem todos respondem de igual forma. Além da evidente diferença na resposta entre tumores HER2⁺ (10% dos casos ER⁺) e HER2⁻, os tumores luminais B HER2⁻ apresentam pior prognóstico e menos sensibilidade ao TAM que os luminais A [65]. De facto, os carcinomas luminais B foram associados a um risco 1.5x superior de relapso e/ou morte após administração de TAM. Pensa-se que este pior prognóstico em tumores luminais B (ER⁺/HER2⁻) se associe ao índice Ki-67 superior e à maior frequência de tumores PR⁻ comparativamente ao subtipo luminal A [65,75,76]. Além da ação do TAM em tumores ER⁺, há casos em que este fármaco inibe o crescimento celular e/ou promove a apoptose em tumores ER⁻. Assim, foi sugerido um mecanismo de ação alternativo independente de ER, possivelmente relacionado com a promoção de um influxo de cálcio [12].

Embora a terapia com TAM seja altamente eficaz, a sua aplicação é limitada devido à resistência adquirida por muitos tumores. De facto, ~33.2% das mulheres medicadas com este fármaco (durante 5 anos) apresentam recorrência de BCa [77]. Os mecanismos responsáveis por esta aquisição de resistência não são claros, tendo-se proposto várias razões para esta ocorrência. Por exemplo, mutações no

gene que codifica o ER α podem levar à perda de expressão deste recetor ou à sobre-expressão de variantes de ER α (como ER α 36) promotoras da atividade agonista do TAM [78,79]. Pode também existir a alteração na expressão dos CoAs e CoRs de ER α . Além disso, a resistência ao TAM pode dever-se à ação de recetores de fatores de crescimento (como HER2) que desencadeiam vias de sinalização que modulam a atividade de ER α (devido a modificações pós-traducionais neste recetor e nos seus co-reguladores), levam ao aumento de ER α extra-nuclear (diminuindo a atividade genómica deste recetor) e podem controlar o crescimento tumoral independente de ER α (geralmente devido à sobre-expressão ou amplificação dos recetores dos fatores de crescimento ou seus ligandos) [80,81]. Além disso, a resistência ao TAM também foi associada a polimorfismos nas proteínas do citocromo P450, especialmente na CYP2D6, que limitam a disponibilidade de metabolitos anti-estrogénicos [81,82]. A sobre-expressão de moléculas anti-apoptóticas (como BCL-XL) e a diminuição de pro-apoptóticas (como caspase 9) também se associaram à resistência ao TAM [80]. Note-se que as causas da resistência mencionadas não são mutuamente exclusivas e que a população de células resistentes está em constante evolução consoante a pressão seletiva existente. Além disso, o facto de haver resistência ao TAM não significa que outras variantes da terapia endócrina não sejam eficazes [83].

Tratamento do cancro da mama com mifepristona

Embora a mifepristona (MF) tenha sido originalmente sintetizada como anti-glucocorticoide, mostrou-se que este esteroide sintético derivado da noretindrona possuía uma forte afinidade para os PRs e uma evidente ação anti-progestagénica [84]. Esta propriedade foi muito explorada, principalmente na medicina reprodutiva, sendo aprovado o uso clínico de MF como agente abortivo e contraceptivo [84,85]. Dada a sobre-expressão dos PRs na maioria dos tumores mamários, foi posteriormente avaliado o efeito anti-tumoral deste fármaco no BCa [86]. Como a sua administração em células mamárias tumorais ER $^{+}$ /PR $^{+}$ (MCF-7) induziu a interrupção do ciclo celular (efeito citostático) e a apoptose (efeito citotóxico), a MF foi sugerida como potencial terapia para os carcinomas PR $^{+}$ [87]. Porém, estudos pioneiros em pacientes portadores de tumores PR $^{+}$ obtiveram resultados desencorajantes (só ~43% dos tumores PR $^{+}$ mostraram responsividade fraca e de curta duração). Ainda assim, estes permitiram aferir que os efeitos adversos do uso prolongado da MF são mínimos (como náuseas e cansaço), resultando das propriedades anti-glucocorticoides deste fármaco [86]. O modelo de carcinogénese mamária utilizado nesta tese permitiu demonstrar que a resposta à MF dependia da expressão das isoformas A e B do PR [88]. Atualmente, o estudo dos efeitos da MF em pacientes previamente classificados de acordo com o padrão de expressão das isoformas do PR está em fase de ensaio clínico [89].

O uso de MF no BCa induz maioritariamente um efeito anti-progestagénico, operando raramente como agonista parcial da Pg. Este fármaco compete com a Pg pela ligação aos PRs, induzindo-se a obtenção de dímeros de PR unido ao ligando: 2[MF+PR], 2[Pg+PR] ou [MF+PR][Pg+PR] [90,91]. Apenas os homodímeros se ligam a regiões alvo no DNA, sendo que os 2[MF+PR] têm maior afinidade. A ligação de MF a PR

altera a conformação do recetor, facilitando o recrutamento de CoRs, o que inibe a transcrição [91–93]. Mas certos contextos (como a elevação de cAMP e/ou a ativação da fosfatase A) podem promover eventos (como a dissociação de CoRs e/ou a ligação de CoAs a PRs) que potenciam a ação progestagénica parcial de MF [94,95]. Além disso, a MF pode levar a efeitos citotóxicos através de mecanismos independentes de PRs [96]. Recentemente, mostrou-se que a MF suprime a proliferação de células tumorais mamárias ER⁺/PR⁺/HER2⁻ e promove a sua apoptose, possivelmente ao inibir a expressão de KLF5, um fator de transcrição sobre-expresso em células de BCa triplas-negativas [13].

Como a maioria dos BCas ER⁺ resistentes a anti-estrogénicos também expressa PRs [18,19], tem-se explorado o benefício clínico do recurso a anti-progestagénicos (em monoterapia ou em combinação com anti-estrogénicos) nestes casos. Mostrou-se que o uso de MF e MF+4-HT em células MCF-7 resistentes a 4-HT teve efeitos citostáticos e citotóxicos [97]. Note-se que, mesmo em células MCF-7 sensíveis a anti-estrogénicos, o recurso simultâneo a MF e 4-HT tem um efeito anti-tumoral aditivo [98]. Esta abordagem pode aumentar a duração da resposta à MF já que o 4-HT se opõe à elevação dos níveis de estrogénio resultantes da ação anti-glucocorticoide da MF [86]. Também em células ER⁺/PR⁺, a terapia MF+4-HT foi mais eficaz do que as monoterapias de MF e de 4-HT, o que pode relacionar-se com o aumento da expressão do inibidor de crescimento TGFβ1 [99].

Em suma, no epitélio mamário a MF apresenta maioritariamente uma ação anti-progestagénica e promove efeitos citostáticos e citotóxicos. A ação anti-glucocorticoide deste fármaco leva a que a sua monoterapia cause alguns efeitos adversos e respostas de curta duração. Assim, além da pesquisa de novos agentes anti-progestagénicos que não antagonizem os glucocorticoides, há grande interesse na combinação da MF com agentes anti-estrogénicos [100]. Atualmente, estão a decorrer diversos ensaios pré-clínicos em mulheres com BCa para testar as vantagens da administração de MF em conjunto com outros tipos de terapias (como quimioterapia e imunoterapia) [101,102].

1.2.2. Causas e consequências da heterogeneidade intra-tumoral

Inicialmente, tentou-se explicar a existência de heterogeneidade intra-tumoral apenas com base nos dois modelos de carcinogénese já mencionados [103]. Segundo o modelo da evolução clonal (Figura 3a), apenas a ocorrência de expansão policlonal justificava a coexistência de sub-populações tumorais (Figura 3b). Já no modelo das células estaminais cancerígenas, este fenómeno era explicado quando várias CSCs originavam o tumor. Atualmente, sabe-se que a variabilidade intra-tumoral é um evento bastante frequente e complexo, podendo associar-se a diversos fatores intrínsecos (como alterações genéticas/epigenéticas, expressão genética diferencial e flutuações em vias de sinalização) e extrínsecos à célula tumoral (por exemplo, relacionados com a ação diferencial dos componentes do microambiente tumoral) [104]. Pensa-se que estes e outros fatores sejam os responsáveis pelos diferentes genótipos e fenótipos presentes no mesmo tumor.

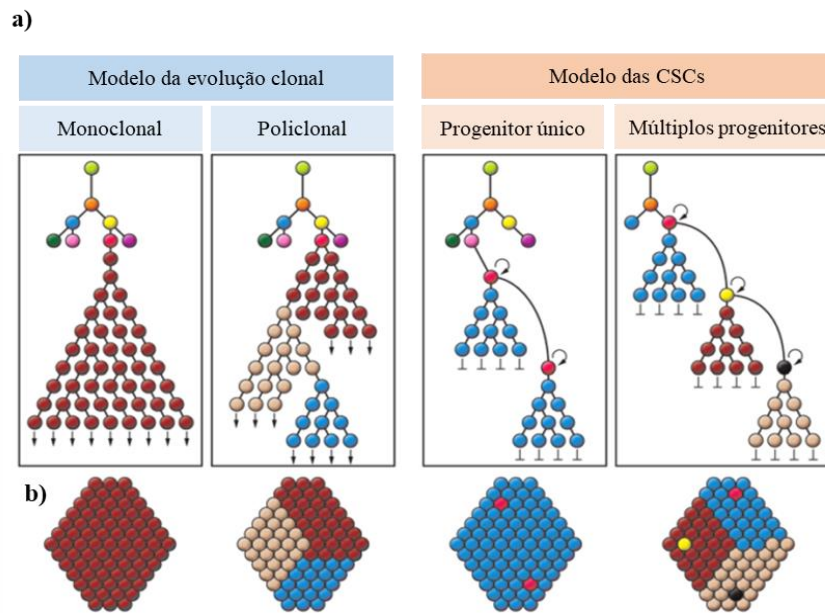


Figura 3 - Representação esquemática (a) da proliferação tumoral com base nos modelos da evolução clonal e das células estaminais cancerígenas (CSCs) com (b) a respetiva distribuição espacial das subpopulações de células tumorais com características distintas. (adaptado da referência [103])

A existência de múltiplas subpopulações celulares ao nível do mesmo tumor (com diferentes características moleculares e sensibilidades terapêuticas) representa um dos principais obstáculos no diagnóstico e tratamento do BCa [34]. Deste modo, vários autores puseram em causa a representatividade do reduzido número de biópsias geralmente avaliado pelos profissionais de saúde. Quanto aos marcadores IHCs mais frequentemente analisados na clínica verificou-se: **a)** que a expressão de ER α , PR e HER2 é relativamente homogênea dentro dos tumores mamários, sugerindo-se que tumores mais agressivos pudessem apresentar maior heterogeneidade destes marcadores [105]; **b)** uma elevada heterogeneidade intra-tumoral de Ki67 [106]. As terapias atualmente aplicadas focam-se principalmente na subpopulação tumoral predominante, havendo o risco de se induzir a proliferação de células resistentes ao tratamento em consequência da pressão seletiva, sendo que estas estão frequentemente associadas a fenótipos mais agressivos [34]. Assim, existe cada vez mais interesse na pesquisa de abordagens terapêuticas que reconheçam a heterogeneidade intra-tumoral do BCa, como a terapia combinada (onde se tenta prever a evolução tumoral principalmente através de algoritmos computacionais de forma a selecionar, logo à partida, os alvos terapêuticos mais relevantes) ou a terapia adaptativa (que adequa constantemente o tratamento às características dinâmicas do tumor).

1.3. Modelos animais no estudo do BCa

Os modelos animais são fundamentais na exploração e caracterização da patofisiologia de diversas doenças, na identificação de alvos terapêuticos e na avaliação *in vivo* de novos tratamentos. Contudo,

os ensaios com animais podem levantar questões éticas e permitem apenas uma representação imperfeita das doenças humanas [107]. Particularmente no BCa, devido à sua heterogeneidade, não há muitos modelos que possuam as características clínicas relevantes da doença [108]. Os modelos disponíveis recorrem maioritariamente a murganhos pelos benefícios que têm associados: pequeno porte, reprodução rápida, tempo de vida relativamente longo, baixo custo, genoma conhecido, genes facilmente manipuláveis e partilha de características fisiológicas com humanos.

1.3.1. Sumário de modelos mais usados no BCa

Todos os tipos de modelos animais comumente usados no estudo do BCa têm prós e contras. Os modelos xenógrafos de linhagem celular (CDXs) ou os derivados de pacientes (PDXs) caracterizam-se, respetivamente, pelo transplante de células cancerígenas humanas imortalizadas ou de um tumor removido do paciente para um murganho hospedeiro imunocomprometido [108,109]. Os tumores dos modelos CDXs são homogêneos, não representando a heterogeneidade intra-tumoral desejada. Já os PDXs mantêm a integridade fenotípica (histopatológica e genética), características comportamentais (como capacidade metástica) e resposta ao tratamento do tumor do paciente original. Mas, em ambos os modelos o microambiente tumoral é influenciado por diferenças intrínsecas entre humanos e murganhos, bem como pela falta de células imunes. Também existem modelos de murganhos geneticamente modificados (GEMMs), onde modificações genéticas induzem a tumorigénese em hospedeiros imunocompetentes. Apesar do seu elevado custo, os GEMMs mimetizam as características patofisiológicas dos tumores e permitem observar as etapas iniciais da tumorigénese [108]. Mas a maioria destes modelos apresenta tumores ER⁻, ainda que nos últimos anos tenham surgido alguns GEMMs que expressam ER [110]. O BCa pode ainda ser quimicamente induzido em murganhos imunocompetentes recorrendo a agentes carcinogénicos (como acetato de medroxiprogesterona - MPA). Em ambos os casos, os carcinomas obtidos podem ser implantados noutros murganhos da mesma estirpe (modelos singénicos) [108,109].

Embora os murganhos forneçam informações úteis acerca do BCa, possuem várias limitações. Por exemplo, o facto de a distribuição dos fármacos no organismo dos modelos animais nem sempre se assemelhar à dos humanos pode influenciar a resposta terapêutica [111]. Apesar de existir uma correspondência razoável entre BCas de humanos e de murganhos, a maioria dos genes com expressão alterada varia entre as espécies [112]. Além disso, há aberrações cromossómicas que estão associadas ao surgimento de carcinomas mamários específicos humanos e que não se verificam em murganhos [113]. Já que a progressão do BCa é influenciada por interações entre as células cancerígenas e os componentes em seu redor, a existência de um microambiente tumoral que mimetize aquele encontrado no tecido tumoral mamário humano foi sugerida como requisito para a representatividade dos murganhos como modelos deste tipo de cancro [114]. O recurso a modelos PDXs humanizados poderia contornar esta

limitação [115,116]. Fleming *et al.* [117] desenvolveram um destes modelos ao introduzir células imunitárias e estromais humanas nas glândulas mamárias de murganhos. Porém, este estudo só focou interações entre células mamárias saudáveis. Mais recentemente, já se recorreu a modelos PDXs com injeção de células mamárias estromais humanas para avaliar o comportamento do tecido tumoral, verificando-se uma maior taxa de proliferação e atividade anti-apoptótica [116]. Contudo, estes modelos ainda não consideram a contribuição do sistema imunitário para a progressão tumoral.

Alguns autores sugerem que a relevância dos estudos que recorrem a murganhos está dependente da sua validação biológica, histopatológica e molecular [118]. Geralmente, a validação molecular baseia-se na comparação entre os padrões de expressão genética dos murganhos e humanos. Embora esta abordagem seja importante, a validação metabolómica fornece informações adicionais que vão além da expressão genética (como a influência do microambiente tumoral) [25].

1.3.2. Modelo de BCa induzido por acetato de medroxiprogesterona (MPA)

O modelo BCa induzido por MPA caracteriza-se pela administração deste agonista de progesterona a murganhos fêmea da estirpe BALB/c, levando à indução química de tumores mamários que, posteriormente, são transplantados singenicamente para a região subcutânea doutros murganhos com e sem exposição a MPA [119]. Este composto promove a expressão de ER α e a migração dos recetores hormonais ativados para o núcleo [120]. No modelo, a interação ER α -PR mostrou-se essencial na proliferação induzida por MPA. Neste caso, considera-se que, na presença de MPA, o nível fisiológico de estrogénio é suficiente para a progressão de tumores de uma forma dependente de hormonas (tumores HD) [119].

Após uma série de transplantes sucessivos, os tumores que passam a crescer na ausência MPA consideraram-se HI (independentes de hormonas), sendo os restantes HD (ambos expressam recetores hormonais) [119]. Sugeriu-se que a independência hormonal pode dever-se à “ativação” do microambiente tumoral, que leva à secreção de fatores de crescimento pelos fibroblastos associados ao carcinoma [121]. Pensa-se que a via de sinalização PI3K/AKT é relevante neste contexto, sendo que os tumores HI são especialmente sensíveis a terapias anti-PI3K/AKT. Esta via pode culminar na fosforilação dos recetores hormonais, tendo-se provado que a ativação dos PRs também é muito importante em tumores HI deste modelo [122].

A significância clínica dos tumores mamários induzidos por MPA relaciona-se com o facto de estes mimetizarem vários aspetos característicos do BCa humano. De facto, os carcinomas que se desenvolvem neste modelo são maioritariamente ductais com expressão de recetores hormonais [119], fenótipo comum à maioria dos tumores mamários humanos [18,19,41]. Os tumores induzidos por MPA mostram-se também promissores na investigação da biologia do BCa e de alvos terapêuticos. Já vários estudos recorreram a este modelo, sendo que a maioria tentou avaliar os mecanismos envolvidos na

progressão/regressão de tumores recorrendo à IHC e/ou imunofluorescência [123]. Atualmente, existe grande interesse na sua exploração com técnicas mais abrangentes (por exemplo, recorrendo a estudos *ômicos*) de forma a identificar alterações biológicas relevantes para o BCa e encaminhar estudos futuros mais dirigidos. Neste contexto, Giulianelli *et al.* [124] recorreram a *microarrays* de cDNA para analisar as alterações transcriptômicas resultantes da ausência de MPA em tumores HD e da aquisição de independência hormonal. Na presente tese efetuar-se-á um estudo metabolômico especificamente nos tumores mamários 59-2-HI e C7-2-HI. Apesar de poucos estudos terem analisado estes dois tipos de tumores em simultâneo, já se sabe que ambos: **a)** são carcinomas ductais moderadamente diferenciados; **b)** metastizam, sendo o tipo C7-2-HI aquele com capacidade metastática superior; **c)** regredem após a terapia anti-hormonal, podendo fazê-lo através de processos distintos; **d)** apresentam níveis superiores de PR_A relativamente a PR_B, sendo que os tumores 59-2-HI possuem uma razão PR_A/PR_B claramente superior ao tipo C7-2-HI [125,126].

1.4. As ciências *ômicas*

1.4.1 Conceitos gerais

As disciplinas *ômicas* englobam principalmente a genómica (estuda as modificações herdadas e somáticas do DNA), a epigenómica (analisa alterações covalentes do DNA que não alteram a sequência de nucleótidos), a transcriptómica (avalia a expressão genética com base no mRNA e no miRNA), a proteómica (analisa as proteínas) e a metabolómica (estuda compostos de baixa massa molecular - metabolitos) [127]. Ainda que a classificação molecular baseada no perfil transcriptómico do BCa seja a mais explorada, cada uma destas *ômicas* permite a divisão dos tumores mamários em subtipos e a pesquisa de biomarcadores clinicamente relevantes [128,129]. Inicialmente, investigava-se cada disciplina *ômica* individualmente, sendo que já é clara a importância da sua análise conjunta para a melhor compreensão dos processos biológicos complexos associados ao cancro [127]. Neste contexto, Koboldt *et al.* [128] avaliaram em simultâneo a genómica, a epigenómica, a transcriptómica e a proteómica do BCa, realizando um dos estudos mais abrangentes na área, contudo não incluíram a metabolómica (a mais próxima do fenótipo). A importância da metabolómica deve-se à dependência do perfil metabólico perante fatores intrínsecos (como mutações) e extrínsecos (como o microambiente tumoral) e com a sua influência na progressão tumoral, na resposta a terapias e no prognóstico do paciente [25].

1.4.2. Metabolómica do cancro da mama

1.4.2.1. Estratégias analíticas

Os estudos metabolômicos podem realizar-se em biofluidos (como plasma ou urina), culturas celulares ou tecidos [26]. Visto que no BCa é frequente ocorrer a recolha de tecido (proveniente de biópsias ou da remoção cirúrgica total do tumor), muitos dos estudos metabolômicos iniciais focaram-se na

pesquisa de biomarcadores de relevância clínica neste tipo de amostra [130] (este assunto será explorado detalhadamente no subcapítulo 1.4.2.2.). Por este procedimento ser bastante invasivo para as pacientes, nos últimos anos tem surgido interesse no estudo de biofluidos, cuja recolha é relativamente fácil. Contudo, a sua análise retrata alterações metabólicas de todo o organismo, dificultando a determinação de biomarcadores específicos do BCa. Muito recentemente, Zhou *et al.* [131] encontraram 9 metabolitos em soro e 3 em urina significativamente diferentes entre pacientes saudáveis e com tumores mamários. Já as linhas celulares têm fácil manutenção e auto-renovação ilimitada, mas a maioria destas não é representativa do tumor primário e é suscetível a modificações genótípicas e fenotípicas aquando da sua cultura continuada [132]. Embora se possam cultivar células diretamente derivadas do tumor mamário, normalmente este procedimento também não tem em consideração as interações que ocorrem *in vivo*. A importância de um microambiente tumoral representativo do BCa relaciona-se com o facto do estroma tumoral ter grande influência nas características das células epiteliais cancerígenas, afetando a proliferação tumoral, a capacidade metastática, a sensibilidade a terapias e o prognóstico da doença [133].

As principais técnicas utilizadas na aquisição de dados metabolómicos são a espetrometria de massa (MS - identifica os metabolitos com base na razão massa/carga das partículas carregadas) e/ou a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN - avalia o comportamento das moléculas expostas a um campo magnético, identificando-as com base na frequência da ressonância dos seus *spins* nucleares). Como ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, a técnica de eleição depende muito do objetivo do estudo. Na verdade, a MS tem uma sensibilidade superior (<pM vs. mM), no entanto apresenta menor reprodutibilidade que a espectroscopia de RMN e requer etapas adicionais de separação de metabolitos (como as cromatografias líquida e gasosa) [134].

Quando possuem números atómico (nº de prótons ou eletrões) e/ou de massa (nº de prótons + neutrões) ímpares, os núcleos têm *spin* e apresentam um *momentum* magnético (μ) e um *momentum* angular (Figura 4a) [135,136]. Estes núcleos caracterizam-se por um número quântico de *spin* (I) diferente de zero. Com um $I=1/2$, cada núcleo do hidrogénio (geralmente designado apenas por protão) pode adotar 2 estados de *spin* (Figura 4b), correspondendo a números quânticos $m_I = -1/2$ (estado de menor energia) e $m_I = +1/2$ (estado de maior energia). Na espectroscopia de RMN ocorre a exposição dos núcleos a um campo magnético externo (B_0) ao longo de um eixo z , promovendo-se a rotação (ou precessão) de cada *momentum* magnético em redor do eixo $+z$ (núcleos com $m_I = +1/2$) ou $-z$ (núcleos com $m_I = -1/2$) com uma determinada frequência angular ω (frequência de *Larmor*). A soma do *momentum* magnético de todos os núcleos expostos a B_0 resulta num vetor de magnetização total ($M = (M_x=0, M_y=0, M_z)$ – Figura 4c). Com o aumento de B_0 , maior será a diferença de energia (ΔE) entre os estados de *spin* (Figura 4b).

Atualmente, a espectroscopia de RMN utiliza uma série de pulsos curtos de radiação de radio-frequência intensa, cujo campo magnético (B_1) coincide com o eixo x (Figura 4c) [135,136]. Ocorre ressonância nuclear quando a frequência de B_1 é equivalente à frequência de *Larmor* dos núcleos, promovendo-se tanto a absorção (m_I passa de $+1/2$ para $-1/2$), como a emissão de energia (m_I passa de $-1/2$ para $+1/2$). Como se verifica uma ligeira tendência inicial para um excesso de núcleos com $m_I = +1/2$ (distribuição de *Boltzmann*), a aplicação de B_1 resulta num excesso de absorção. A exposição dos núcleos a B_1 exerce uma força sobre M , induzindo a sua movimentação em direção ao eixo y e, portanto, M_x e M_y passam a ser diferentes de zero (Figura 4c). Aplicar pulsos de 90° significa que se expõem os núcleos a B_1 durante tempo suficiente para que M alcance y (ou seja, haja um ângulo de 90° em relação à sua localização inicial no eixo z). No final de cada pulso, os núcleos retomam a sua posição de equilíbrio em torno do eixo z (relaxamento). Durante este processo emite-se radiação eletromagnética (*free induction decay* - FID) que é detetada e apresentada sob a forma de um gráfico de sinal em função do tempo, que é posteriormente convertido computacionalmente por aplicação da transformada de *Fourier* num espectro cujo sinal aparece em função da frequência de radiação absorvida.

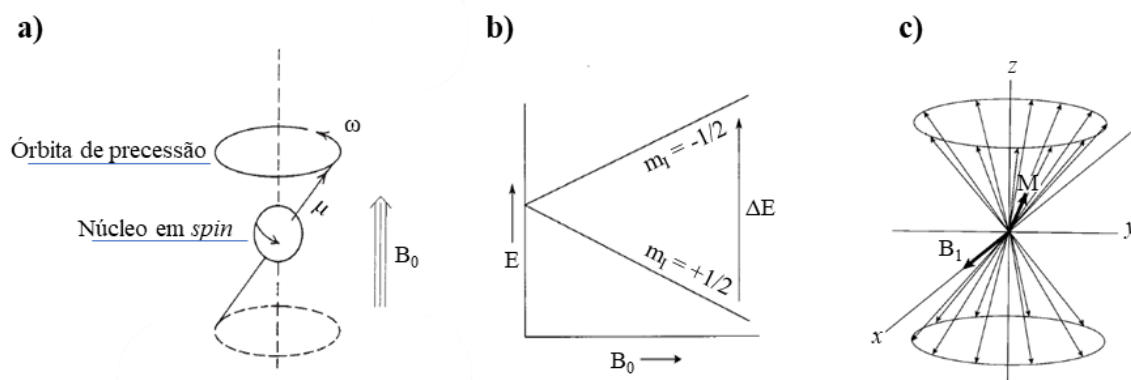


Figura 4 – Representação esquemática de: **a)** movimento de precessão de um núcleo em *spin* como resultado da aplicação de um campo magnético (B_0); **b)** diferença de energia (ΔE) entre os estados de *spin* de um próton com a aplicação de um B_0 crescente; **c)** movimentação do vetor da magnetização (M) como consequência da exposição ao campo magnético B_1 , destaca-se também a precessão de núcleos em torno do eixo z , verificando-se a tendência para um número superior de núcleos com $m_I = +1/2$ (distribuição de *Boltzmann*). m_I , número magnético quântico; μ , *momentum* magnético; ω , frequência angular ou de *Larmor*. (Adaptado das referências [135,136])

Sendo partículas carregadas em movimento, os elétrons em redor do núcleo também possuem *momentum* magnético e produzem um campo magnético local que se opõe ao B_0 , reduzindo o campo magnético realmente experienciado [135,136]. Deste modo, dependendo da densidade eletrónica que o rodeia, cada próton pode estar mais ou menos protegido (*shielded*) do campo B_0 e, consequentemente, associado a uma menor ou maior frequência de ressonância. Assim, a espectroscopia de RMN mostra-se extremamente útil uma vez que, dependendo do seu ambiente químico/elétrico vizinho, os prótons

apresentam diferentes frequências de ressonância, o que permite identificar moléculas e as suas estruturas, desde pequenas moléculas a biomoléculas maiores como as proteínas. De forma a considerar a influência da frequência do espectrómetro de RMN (em MHz) na frequência de ressonância dos núcleos (em Hz), definiu-se o desvio químico (δ em Hz/MHz = ppm) como unidade padrão dos espectros de RMN. O desvio químico de cada pico do espectro é atribuído em relação ao sinal de um composto de referência, que se caracteriza por ser solúvel no solvente utilizado e não reativo. Para este fim, em RMN de ^1H é comum marcar-se a posição $\delta=0$ ppm, por exemplo, com o sinal de ácido 3-trimetilsilil propiônico (TSP – com elevada solubilidade em água) ou tetrametilsilano (TMS – altamente solúvel em solventes orgânicos), sendo que ambos apresentam grupos metilo ligados a um átomo de silício, um elemento químico de baixa eletronegatividade que garante um *shielding* muito elevado dos prótons.

Com o intuito de analisar o metaboloma de tecidos, a espectroscopia de RMN pode realizar-se [137]: **a)** diretamente no tecido do paciente (*in vivo*), o que permite a análise não invasiva do perfil metabólico, mas normalmente requer técnicas imagiológicas (MRI) adicionais e associa-se a uma resolução espectral e sensibilidade baixas; **b)** mediante a extração de metabolitos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis (*in vitro*), possibilitando uma resolução espectral e sensibilidade elevadas, contudo o processo de extração é destrutivo e pode levar à perda de metabolitos; **c)** após a excisão de tecido intacto (*ex vivo*), o que contorna algumas das limitações da abordagem *in vitro*. Sendo o tecido um material semi-sólido, a mobilidade das suas moléculas está condicionada, promovendo a existência de bandas mais largas nos espectros de RMN comparativamente aos extratos. Neste contexto é útil recorrer-se à espectroscopia de RMN com elevada resolução com rotação segundo o ângulo mágico (HRMAS), onde a rápida rotação (alguns kHz) das amostras segundo o ângulo mágico de 54.7° relativamente ao campo magnético externo permite obter espectros com alta resolução a partir de tecido intacto. O facto da preparação das amostras para espectroscopia de RMN com HRMAS não requerer a extração de metabolitos permite estudos posteriores na mesma amostra.

Os métodos de análise estatística univariada e multivariada permitem, respetivamente, a avaliação individual e simultânea de variáveis. Em metabolómica, geralmente começa por se aplicar a análise dos componentes principais (PCA - método estatístico multivariado e não supervisionado), que permite avaliar o comportamento metabólico intrínseco das amostras de forma independente da sua classe [138]. Para tal, e como se pode observar na Figura 5, os espectros de RMN são convertidos numa matriz com x colunas (correspondentes aos desvios químicos, em ppm) e y linhas (correspondentes às n amostras). Ao reduzir o grande número de variáveis originais (neste caso desvios químicos) para um menor número de novas variáveis ortogonais (componentes principais - PCs), a PCA tem como objetivo extrair informação importante da matriz e exibi-la de forma mais facilmente interpretável. Para a construção do diagrama de *scores* da PCA representado na Figura 5 considera-se

apenas o plano formado pelos PCs que melhor representam a variabilidade original (ou seja, PC1 e PC2) no qual são projetados dos dados. É neste gráfico que se observam eventuais agrupamento das amostras com perfis metabólicos mais semelhantes e/ou *outliers*. A PCA também permite obter diagramas de *loadings*, que demonstram a contribuição de variáveis individuais na distribuição das amostras. Segue-se a aplicação de métodos supervisionados de análise estatística multivariada, como a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Neste caso, verifica-se se existe correlação entre a matriz acima descrita e uma segunda matriz que contém a informação relativa à classe das amostras. À semelhança da PCA, a PLS-DA também permite obter diagramas de *scores* e *loadings*. Para evitar o *overfitting* dos modelos estatísticos aos dados originais (incapacidade de generalização), estes devem ser validados de forma a avaliar a sua aplicabilidade [139].

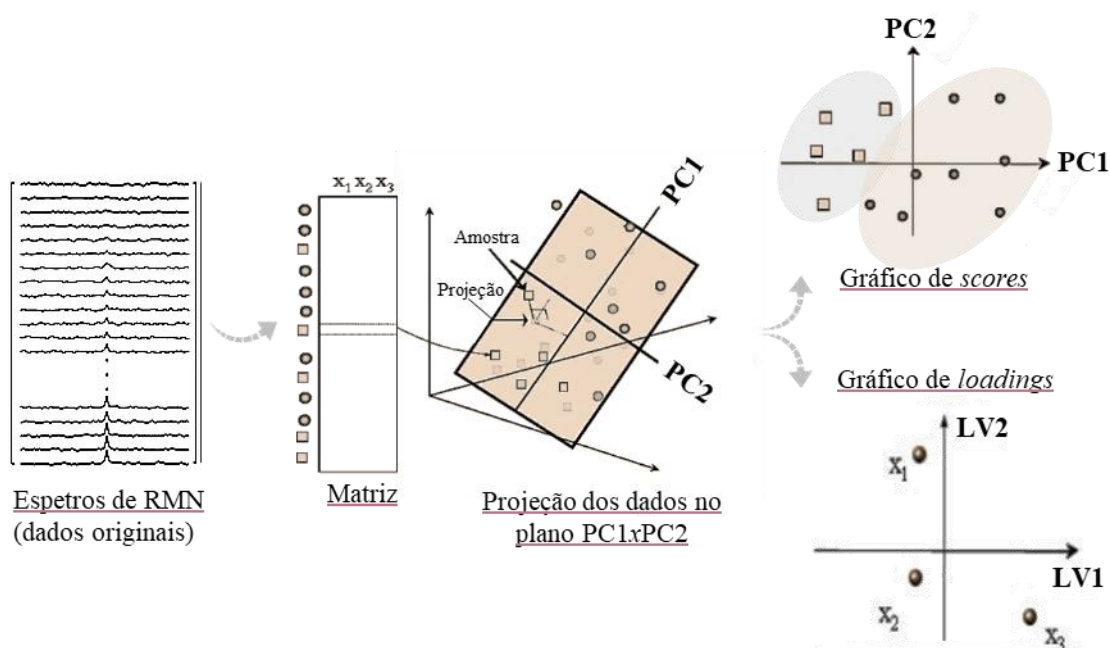


Figura 5 - Representação esquemática da análise de componentes principais (PCA) aplicada a dados de espectroscopia de RMN (adaptado da referência [138]). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; x_n , variáveis (neste caso, desvios químicos em ppm); \square e \bullet , amostras de classes distintas.

Após a determinação das principais diferenças metabólicas entre as classes em estudo através da análise estatística multivariada, procede-se à avaliação da sua relevância estatística (análise univariada) [139]. A seleção do teste estatístico mais indicado depende se as amostras são independentes (*e.g.* comparação do perfil metabólico de indivíduos doentes e saudáveis) ou emparelhadas (*e.g.* comparação do perfil metabólico antes e após um tratamento) e do tipo de distribuição dos resultados. Geralmente considera-se que um *p-value* < 0.05 reflete significância estatística admitindo-se, portanto, 5% de probabilidade da variação observada ser aleatória. Além disso, é frequente calcular o *effect size* (ES) de forma a analisar a magnitude das diferenças metabólicas observadas em cada modelo estatístico [140].

1.4.2.2. Estado da arte – Estudos metabolómicos em tecido tumoral mamário

Considerando que a presente tese incide no estudo metabolómico de tecido tumoral mamário, neste subcapítulo pretende-se fazer o estado da arte dos estudos metabolómicos realizados até ao momento em tecido tumoral mamário de pacientes e de murganhos. Neste contexto importa referir que, em geral, a maioria dos autores explorou o metaboloma tumoral mamário analisando tecido intacto (por RMN com HRMAS) ou extratos aquosos de obtidos pelo método do ácido perclórico (PCAc) [141–143].

Humanos

Diversos estudos metabolómicos em tecido mamário focaram-se na investigação de biomarcadores de diagnóstico, principalmente para a distinção entre tecido tumoral e normal. Os primeiros perfis metabólicos de tecido tumoral mamário obtiveram-se na década de 80 por espectroscopia de RMN de ^{31}P *in vivo* e em extratos polares [130,144]. Comparativamente com o tecido normal, verificou-se que o tecido tumoral apresentava níveis mais elevados de compostos lipídicos como fosfomonoésteres (PMEs) e fosfodiésteres. Posteriormente, confirmou-se a contribuição da fosfocolina (PC) e da fosfoetanolamina (PE) para o sinal dos PMEs [145]. Em relação ao tecido normal, o tecido tumoral também se associou a níveis significativamente superiores de intermediários da glicólise (como o glicerol-3-fosfato) e inferiores de fosfocreatina (fonte de fósforo) [144].

Na mesma época, um dos grupos de investigação acima mencionados [130] também tentou aplicar RMN de ^1H *in vivo*, obtendo-se espectros com pouca resolução. Ainda assim, constatou-se que a razão entre os sinais da água e da gordura era superior em tecido tumoral comparativamente a tecido normal. O primeiro estudo mais detalhado em extratos de tecido tumoral mamário por RMN de ^1H foi realizado em 1994 [146]. Neste, os compostos hidrossolúveis extraíram-se com ácido perclórico (PCAc), identificando-se mais de 30 metabolitos no tecido tumoral mamário. O metaboloma tumoral mostrou níveis superiores de lactato, vários aminoácidos, succinato, PC e hexoses de uridina difosfato e a inferiores de fosfocreatina, glucose e *myo*-inositol [146]. Estes resultados foram ao encontro da reprogramação metabólica característica das células tumorais já referida (subcapítulo 1.3.3.). Diversos estudos posteriores vieram a propor possíveis explicações para as características do metaboloma tumoral. Por exemplo, pensa-se que a ativação de recetores de fatores de crescimento promove vias de sinalização que culminam no aumento da expressão do transportador de glucose GLUT1 e da atividade da lactato desidrogenase A (LDH-A), com o consequente aumento do consumo de glucose pelas células e da formação de lactato [147,148]. O facto de o tecido tumoral ter apresentado níveis inferiores de glucose refletiu a sua

maior necessidade de energia em relação ao tecido normal. Sugeriu-se também que as células cancerígenas podiam sobre-expressar uma variante da piruvato cinase menos ativa, levando à acumulação de intermediários glicolíticos que ficavam disponíveis para síntese de macromoléculas [149]. Só em 1998, com o recurso a espectroscopia de RMN de ^1H com HRMAS e aplicando a sequência pulsada *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (remove os sinais de macromoléculas), se obteve uma boa resolução espectral a partir de tecido tumoral mamário intacto (Figura 6A) [150]. Mesmo com o elevado teor lipídico mamário, diferenciaram-se vários

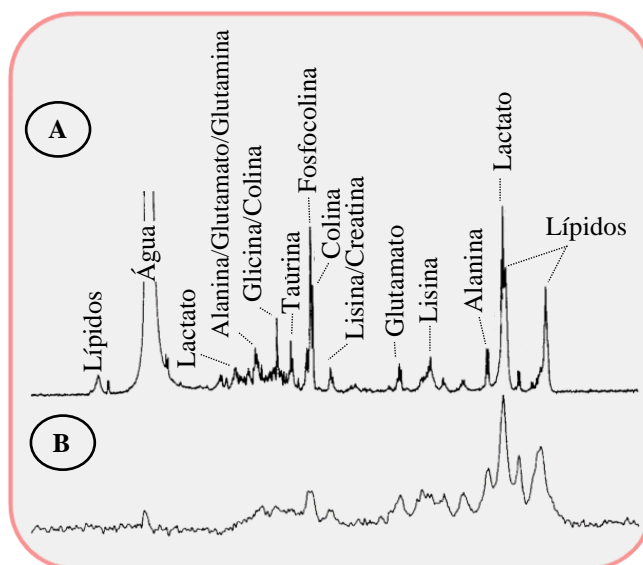


Figura 6– Exemplo de perfis metabólicos obtidos a partir de tecido tumoral mamário maligno intacto por RMN com HRMAS de ^1H (A) e RMN de ^1H convencional (B). (Adaptado da referência [150])

lipídicos mamário, diferenciaram-se vários metabolitos indistinguíveis com a RMN de ^1H unidimensional (Figura 6B). Por exemplo, foi possível a atribuição de picos específicos aos CCMs, constatando-se que o tecido tumoral tinha níveis superiores de PC e colina, e inferiores de glicerofosfocolina (GPC) [151]. Estas alterações metabólicas podiam resultar da sobre-expressão da colina cinase e da fosfolipase C no tecido tumoral relativamente ao normal [152]. Com base nas intensidades relativas dos picos dos CCMs presentes no espectro de RMN com HRMAS foi possível distinguir o tecido tumoral ($n=85$) do normal ($n=18$) com 82% de sensibilidade e 100% de especificidade [151]. Embora se tenha observado que o perfil metabólico obtido por RMN com HRMAS variava pouco com a localização intra-tumoral, comprovou-se recentemente que os níveis de certos metabolitos (especialmente PC e PE) diferiam conforme a localização intra-tumoral (centro vs. periferia) e o modo de recolha do tecido (biópsia com agulha vs. remoção total do tumor), sendo essencial validar a metodologia para a implementação clínica de biomarcadores avaliados numa amostra única [153].

Também se utilizou a MS para comparar o metaboloma de extratos de tecido mamário tumoral e normal. Budczies *et al.* [154] construíram o primeiro mapa metabólico de BCa recorrendo a cromatografia gasosa seguida de MS com analisador de tempo de voo (GC-TOF-MS). Apesar de se terem identificado 368 sinais com variação significativa entre tecido tumoral ($n=271$) e normal ($n=98$), nenhum deles demonstrou especificidade razoável para ser usado como biomarcador de diagnóstico. Só a seleção simultânea de 20 metabolitos permitiu a deteção do tecido tumoral com sensibilidade e especificidade $>80\%$. Entre as razões de metabolitos medidas, destacou-se a citidina-5-monofosfato/pentadecanoato,

por diferenciar tecido tumoral e normal com uma sensibilidade de 94.8% e uma especificidade de 93.9%. Relativamente ao tecido normal, o tecido tumoral associou-se a níveis menores de quase todos os ácidos gordos (FAs) livres testados, demonstrando a sua rápida metabolização em fosfolípidos membranares.

Outros trabalhos mostraram interesse na distinção entre tumores mamários benignos e malignos [155,156]. Com este intuito, desenvolveu-se uma estratégia estatística com 3 etapas (seleção de regiões espectrais discriminatórias, análise linear discriminante das regiões e diagnóstico de consenso computorizado) para classificar biópsias de tecido tumoral como malignas ou benignas (com 92.4% de sensibilidade e 92.7% de especificidade) [155]. Numa meta-análise de 2013 avaliou-se o poder de diagnóstico da RMN de ^1H em 19 estudos, averiguando-se que a observação dos sinais dos CCMs permitia diferenciar tumores malignos e benignos com uma especificidade elevada (88%) e uma sensibilidade relativamente baixa (73%) e variável [156]. Embora diversos estudos tenham relacionado estes metabolitos com a malignidade tumoral, a sua elevação também ocorre em certos contextos fisiológicos (como na amamentação), podendo considerar-se como biomarcadores da elevada atividade metabólica [157].

O metaboloma do tecido tumoral mamário varia com as características histológicas do BCa [158,159]. Recorrendo a RMN de ^1H , averiguou-se que os níveis de hexoses de uridina difosfato, PC e PE variavam com o estágio histológico dos carcinomas mamários ductais [158]. Através de RMN com HRMAS, verificou-se que a razão lactato/colina se relacionava positivamente não só com o estágio, mas também com o tamanho do tumor [150]. Após a aplicação de várias análises estatísticas aos dados, verificou-se que a eliminação de variáveis não informativas por PLS seguida da rede neuronal probabilística era a que melhor previa o estágio por garantir uma sensibilidade e especificidade >86% [159]. Também se distinguiram os casos de DCIS com e sem componentes invasivos, já que a ausência de invasão se associou à elevação dos níveis de *myo*-inositol, succinato e da razão GPC/PC [160]. A PLS-DA ortogonal permitiu esta distinção com uma sensibilidade de 86.7% e uma especificidade de 80%.

O metaboloma do tecido tumoral mamário também varia entre subtipos IHCs [161]. Em relação aos tumores $\text{ER}^+/\text{PR}^+/\text{HER2}^+$, os $\text{ER}^-/\text{PR}^-/\text{HER2}^-$ mostraram níveis superiores de colina, GPC e glutamato, e inferiores de creatina e glutamina [161]. A aplicação de PLS-DA aos dados de RMN com HRMAS separou estes subtipos IHCs com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 75.4%. Além disso, sugeriu-se que mutações no gene *BRCA1* (que normalmente causa tumores $\text{ER}^-/\text{PR}^-/\text{HER2}^-$) podiam inibir a síntese de FAs, promovendo a sua β -oxidação com a consequente elevação de metabolitos associados a este processo [162]. Ao integrar metabolómica (por GC-TOF-MS) com transcriptómica propôs-se que a sobre-expressão da glicerol-3-fosfato aciltransferase (comum em tumores ER^-/PR^-) induzia o aumento do teor fosfolipídico (especialmente de PC e PE) [163]. A sobre-expressão desta enzima alterou significativamente os níveis de muitos outros metabolitos (>50).

Outros estudos avaliaram a influência específica de cada recetor no perfil metabólico [164,165]. Verificou-se que a ausência de HER2 levava a níveis inferiores de glicina, glutamina, succinato e

creatina, e superiores de alanina, independentemente do estágio tumoral [164]. Em relação aos tumores ER⁺, os ER⁻ expressaram mais glicina, GPC, colina, lactato e alanina, e menos ascorbato, creatina, taurina e PC [165]. Contrariamente à ausência de ER, tumores PR⁻ tiveram níveis mais elevados de ascorbato e creatina. O facto de a ausência de PR levar a alterações metabólicas independentes de ER sugeriu que o PR tem valor prognóstico além de ER [166]. Recorrendo a MS, verificou-se que 75 metabolitos variavam significativamente entre tumores ER⁻ e ER⁺ [162]. A sua maioria esteve aumentada na ausência de ER, destacando-se os metabolitos glicogenolíticos (como a maltopentose, maltotriose e maltose), os glicolíticos (como a glucose-6-P e lactato), a glutatona (reduzida e oxidada) e os FAs de cadeia longa. Já os carcinomas ER⁺ tiveram maior teor em derivados da carnitina e FAs de cadeia curta e média. Nesta investigação verificou-se grande heterogeneidade nos tumores ER⁺, ficando parte dos carcinomas luminais A agrupados com tecido normal. Estes resultados apoiaram os obtidos por Borgan *et al.* [167], que sugeriram a existência de classes distintas no subtipo luminal A com base nos espectros obtidos por RMN com HRMAS. Entre estas, a A₂ (caracterizada por níveis superiores de alanina e lactato e inferiores de glucose) foi relacionada com BCa mais proliferativo e agressivo. Recentemente, distribuíram-se tumores mamários em grupos com base no seu metaboloma [129]. O facto destes grupos metabólicos não coincidirem com os subtipos moleculares intrínsecos baseados na transcriptómica sugeriu que a análise metabolómica fornece informação adicional que vai além da expressão genética.

Muitos dos estudos metabolómicos realizados em tecido tumoral mamário humano tentaram ainda prever e monitorizar a ação da quimioterapia [168–170]. Recorrendo a RMN com HRMAS, analisaram-se biópsias de tecido tumoral (n=89) extraídas antes e depois da quimioterapia, comprovando-se a alteração do perfil metabólico [168]. A PLS-DA obtida distinguiu as amostras recolhidas pré- e pós-tratamento com 87.9% de sensibilidade e 68.9% de especificidade. Os tumores responsivos mostraram níveis menores de GPC e maiores de lactato e glicina, podendo estes considerar-se potenciais biomarcadores de regressão tumoral. Constatou-se ainda que os pacientes não sobreviventes (< 5 anos) possuíam níveis aumentados de lactato após a terapia. Já os sobreviventes (≥ 5 anos) associaram-se a um decréscimo dos níveis de glicina e CCMs, e a um acréscimo no teor de glucose. Como a sobrevivência apenas se pôde prever com base nos espectros pós-tratamento sugeriu-se que a diferença entre os sobreviventes e não-sobreviventes resultou da resposta metabólica ao tratamento. Avaliando vários graus de resposta à quimioterapia, verificou-se uma tendência dos tumores com resposta patológica completa (definida como a ausência de BCa invasivo) para o aumento da razão PC/creatina e do nível de CCMs [169]. Além disso, a aplicação da PLS-DA ortogonal aos dados pós-tratamento diferenciou os pacientes com um volume de tumor estável, os que demonstram uma resposta completa e aqueles com uma resposta parcial (com ≥84.6% de sensibilidade e ≥90% de especificidade). A previsão da sobrevivência associada a uma terapia e da resposta terapêutica *a priori* possibilitava a seleção de tratamentos potencialmente mais eficazes, daí o interesse na pesquisa de biomarcadores para esse efeito. Neste contexto, Cao *et al.* [170]

relacionaram níveis pré-tratamento superiores de CCMs e inferiores de lactato aos sobreviventes. Relativamente às análises pós-tratamento, os melhores biomarcadores da sobrevivência a longo prazo e da resposta terapêutica foram a GPC e a taurina, respetivamente. Noutra investigação, níveis mais baixos de glucose e mais altos de lactato antes da quimioterapia corresponderam a boas respostas terapêuticas de tumores HER2⁻ [171]. Contudo, ainda não se conseguiu prever que tumores apresentavam respostas patológicas completas antes da quimioterapia.

Atualmente, muito poucos estudos se dedicaram especificamente ao impacto da heterogeneidade intra-tumoral no perfil metabólico dos tumores mamários. Recorrendo a RMN de ¹H com HRMAS, Gogiasvili *et al.* [172] analisaram 6 biópsias por tumor mamário (n=3), cujos perfis metabólicos foram usados para a construção de um algoritmo supervisionado de previsão da identidade tumoral (tumor 1, 2 ou 3). A capacidade preditiva deste modelo foi avaliada através do teste de 2-4 novas biópsias por tumor, tendo-se previsto a verdadeira identidade tumoral com uma exatidão de 89%. Apesar de ser clara a heterogeneidade metabólica intra-tumoral, os autores sugerem que a variabilidade entre tumores é superior, sendo o que contribui para a correta classificação. Neste contexto importa mencionar que os 3 tumores analisados neste estudo apresentavam características histológicas bastante distintas, podendo pertencer a diferentes subtipos de BCa.

Murganhos

Alguns estudos metabolômicos em tecido tumoral mamário de modelos PDXs tentaram compreender a biologia do tumor e averiguar a sua representatividade em humanos. Recorrendo a RMN com HRMAS, analisou-se o metaboloma de subtipos distintos de BCa de murganhos (modelos PDXs *luminal-like* e *basal-like*) para determinar diferenças entre eles, permitindo a sua comparação com resultados de tumores humanos (ER⁻/PR⁻/HER2⁻ e ER⁺/PR⁺) [173]. Dada a importância dos CCMs como potenciais biomarcadores de diagnóstico do BCa humano [151,156], selecionou-se uma região espectral que incluiu sinais característicos destes compostos [173]. Considerou-se uma correspondência razoável entre o metaboloma dos PDXs e dos humanos já que os tumores ER⁺/PR⁺ (Figura 7A) e *luminal-like* (Figura 7C) apresentaram uma razão GPC/PC inferior aos tumores ER⁻/PR⁻/HER2⁻ (Figura 7B) e *basal-like* (Figura 7D). Pensa-se que estas diferenças metabólicas se possam dever à menor expressão de colina cinase e maior expressão de fosfolipase A2 no modelo *basal-like*. Noutro estudo [174], recorreu-se a RMN de ¹³C (de abundância natural) e de ¹H com HRMAS para analisar modelos PDXs. A PCA dos dados de ambas as variantes de RMN (Figura 8) permitiu uma boa discriminação entre os modelos *luminal-like* (n=9) e *basal-like* (n=10) [174]. Segundo os dados de RMN de ¹³C com HRMAS, os modelos *luminal-like* (Figura 8A,B) apresentaram níveis superiores de FAs, taurina e gliceril, e inferiores de glucose, glicina e glutamato. Já nos resultados de RMN de ¹H com HRMAS (Figura 8C,D), foi evidente que os modelos *luminal-like* tinham maior teor em PC, taurina, lactato, creatina e alanina, e menor em GPC, glicina,

glutamato e glutamina. A maioria destes resultados apoiam estudos metabolômicos realizados em tecido tumoral humano [162,165]. Apesar de ainda não terem sido realizados estudos estatísticos diretos que comparassem os metabolomas de subtipos de BCa específicos de humanos e de murganhos, as diferenças entre as espécies já mencionadas (subcapítulo 1.3.1.) levam a crer que também o perfil metabólico varia entre elas. Esta análise já foi realizada no cancro colorretal, constatando-se que, de facto, os tumores de murganhos e de humanos eram estatisticamente diferentes [175].

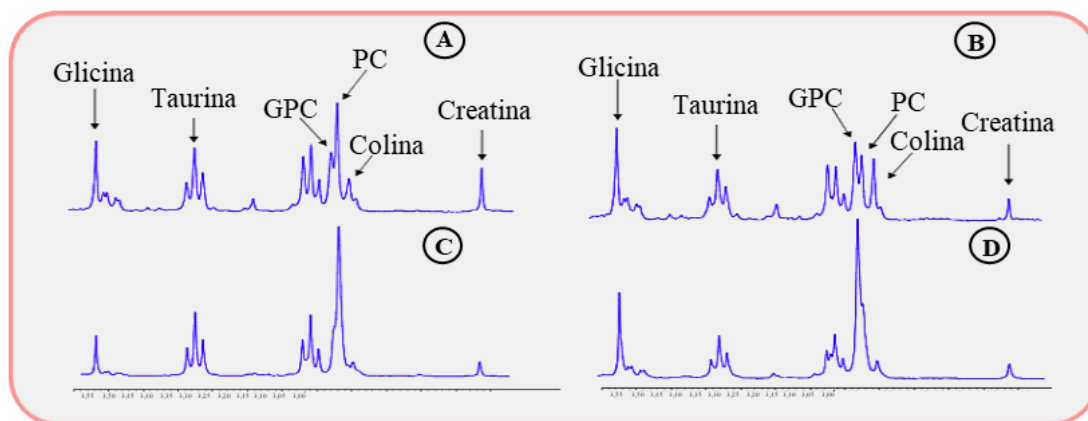


Figura 7– Perfis metabólicos na região espectral 3.60-3.00 ppm obtidos recorrendo a RMN de ^1H com HRMAS em tecido tumoral mamário de humanos (ER $^{+}$ /PR $^{+}$ em **A** e ER $^{+}$ /PR $^{-}$ /HER2 $^{-}$ em **B**) e modelos PDXs (*luminal-like* em **C** e *basal-like* em **D**). GPC, glicerofosfocolina; PC, fosfocolina. (Adaptado da referência [173])

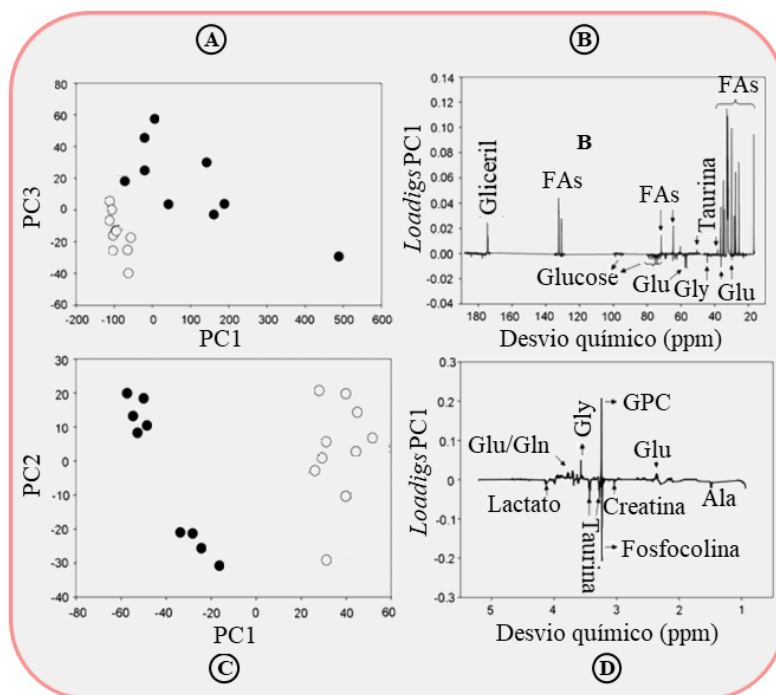


Figura 8– Diagramas de *scores* (**A** e **C**) e de *loadings* (**B** e **D**) do 1º componente principal (PC1) obtidos por PCA e realizados nos espectros de RMN de ^{13}C com HRMAS (**A** e **B**) e RMN de ^1H com HRMAS (**C** e **D**) de 2 modelos PDXs. ●, modelo *luminal-like*; ○, modelo *basal-like*; GPC, glicerofosfocolina; FAs, ácidos gordos. (Adaptado da referência [174])

Muitos dos estudos metabolômicos em murganhos com BCa avaliaram a resposta terapêutica a fármacos clinicamente aprovados. Usando modelos CDXs (obtidos pelo implante de células MCF-7 e MDA-MB-231 em murganhos SCID), analisou-se a resposta metabolômica a docetaxel (quimioterapêutico) por RMN de ^{31}P *in vivo* e em extratos [176]. Em relação à terapia placebo, este fármaco induziu um decréscimo de PC e um acréscimo de GPC (Figura 9A,B). Dado que só a PC variou significativamente com o tratamento (Figura 9C,D), foi sugerida como potencial marcador de monitorização à resposta terapêutica. O efeito deste fármaco também foi explorado noutros modelos CDXs (obtidos pelo implante de células MCF-7 em murganhos BalbC/c nu/nu) [177]. A PCA dos espetros de RMN de ^1H *in vivo* mostrou que a principal diferença entre o tecido tumoral com e sem tratamento foi o maior teor em CCMs nos tumores sujeitos a docetaxel (Figura 10B,D). Tal foi confirmado com a análise PLS nos espetros de RMN de ^1H com HRMAS (Figura 10A,C), já que o tecido tumoral não tratado teve maior teor em PC e GPC, enquanto que o tecido tumoral tratado mostrou níveis mais elevados de creatina e taurina. Usando murganhos com o gene *BRCA1* mutado (semelhantes ao subtipo *basal-like* humano), tentou-se identificar biomarcadores de resistência a docetaxel [178]. Neste caso, os modelos animais foram obtidos através do transplante singénico de tumores de GEMMs para murganhos *wild type*. A PCA aos dados de RMN com HRMAS pré-tratamento revelou que os tumores resistentes possuíam níveis superiores de CCMs e inferiores de glicina, taurina e creatina. Ao longo da terapia verificou-se que, embora a concentração relativa dos CCMs fosse superior no tecido tumoral resistente, só no tecido tumoral sensível houve um aumento transitório dos níveis destes compostos. Assim, sugeriu-se que os níveis dos CCMs (pré- e pós-tratamento) tinham o potencial de prever a resposta ao docetaxel. Como o uso de bevacizumab e/ou doxorubicin (quimioterapêuticos) mostrou resposta diferencial em modelos PDXs *luminal-like* e *basal-like*, explorou-se que alterações metabolômicas e transcriptômicas surgiam após a terapia com estes fármacos [179]. Recorrendo a RMN com HRMAS, verificou-se que a monoterapia de bevacizumab só levou a alterações no metaboloma do tecido tumoral *basal-like*, sugerindo-se a GPC como potencial marcador para a resposta a este fármaco. Além disso, os tratamentos mais eficientes (ou seja, bevacizumab+doxorubicin para o modelo *basal-like* e monoterapia de doxorubicin para o modelo *luminal-like*) foram os acompanhados por mais alterações da expressão genética.

Têm surgido terapias alvo alternativas que inibem vias de sinalização importantes para o desenvolvimento do BCa (como a PI3K/AKT/mTOR) ou proteínas diretamente envolvidas no consumo e metabolismo de nutrientes [180]. A eficácia destas é frequentemente avaliada em murganhos. Por exemplo, o fármaco everolimus (análogo de mTOR) já foi aprovado para tumores mamários ER⁺ e HER2⁺ em combinação com outros fármacos [181]. Como anomalias na via PI3K/AKT/mTOR também ocorrem em carcinomas ER⁻/PR⁻/HER2⁻, recorreu-se a modelos PDXs representativos deste subtipo tumoral para avaliar a resposta metabólica ao fármaco em questão [182]. A terapia com everolimus levou ao acréscimo de glucose, glutamina e alanina, e ao decréscimo de PC, GPC e lactato/glucose

[182]. Embora os fármacos até agora mencionados já estejam aprovados para o tratamento de certos tipos de BCa humano (em monoterapia ou em combinação com outros fármacos) [183,184], também se testaram terapias em murganhos que só se encontram em ensaios pré-clínicos. Moestue *et al.* [185] exploraram as alterações metabólicas causadas por BEZ235 (inibidor de PI3K e mTOR) e MK-2206 (inibidor de Akt) em modelos PDXs *luminal-like* e *basal-like*. Enquanto que o perfil metabólico do modelo *luminal-like* permaneceu idêntico após a administração de cada fármaco, o modelo *basal-like* mostrou um aumento do nível de PC e diminuição de lactato [185]. O BEZ235 também elevou o teor em GPC e glucose. Sugeriu-se que os metabolitos alterados podiam usar-se como marcadores de monitorização da resposta terapêutica aos fármacos em questão. Noutro estudo recorreu-se a RMN de ^{31}P com HRMAS para avaliar a resposta metabólica a BEZ235 em modelos *luminal-like* e *basal-like* (obtidos pelo transplante de tecido tumoral mamário humano em murganhos SCID, com o posterior transplante singénico para murganhos Balb/C nu/nu) [186]. Também aqui só os modelos *basal-like* tiveram alterações metabólicas significativas, com a redução de PE e o aumento de PC e GPC, sugerindo-se que os níveis mais elevados deste último metabolito podiam dever-se à sobre-expressão da fosfolipase A2. Recentemente, explorou-se o valor terapêutico de um inibidor desta enzima no modelo *basal-like* referido, verificando-se níveis aumentados de PC e diminuídos de GPC [187].

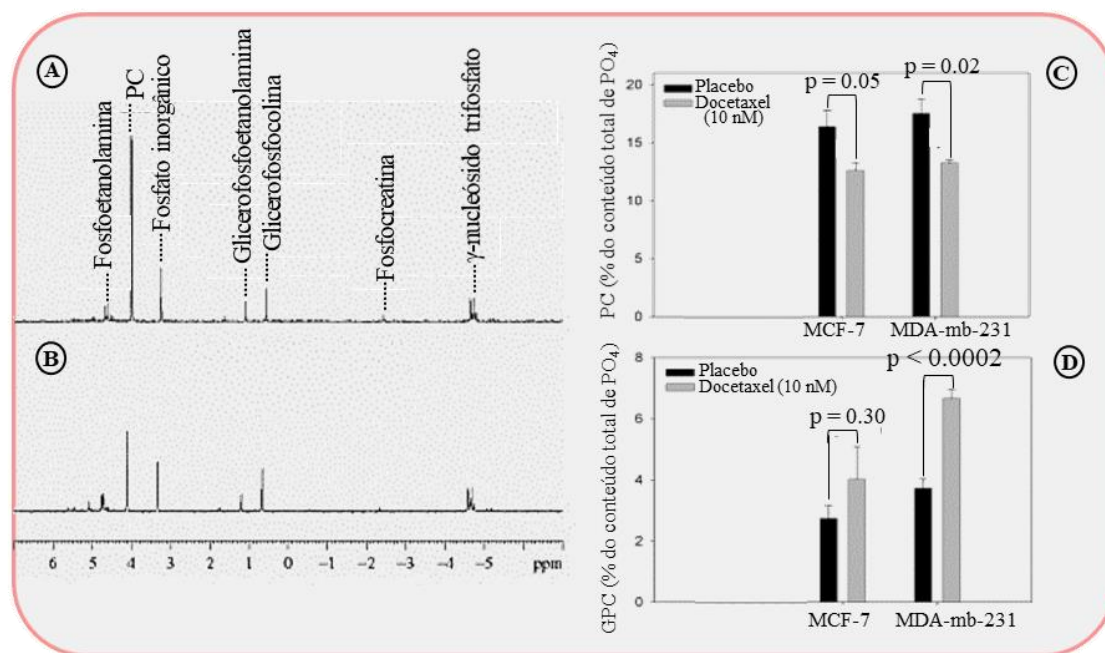


Figura 9— Perfis metabólicos obtidos a partir de extratos de tecido tumoral mamário de modelos CDXs MDA-mb-231 (ER/PR/HER2⁺) recorrendo a RMN de ^{31}P 48h após o tratamento placebo (A) e 30 mg/kg de docetaxel (B). Percentagem média (n = 4) de alteração nos níveis de PC (C) e GPC (D) após o tratamento de células MCF-7 e MDA-mb-231 com 10 nM de docetaxel. PC, fosfocolina; GPC, glicerofosfocolina. (Adaptado da referência [176])

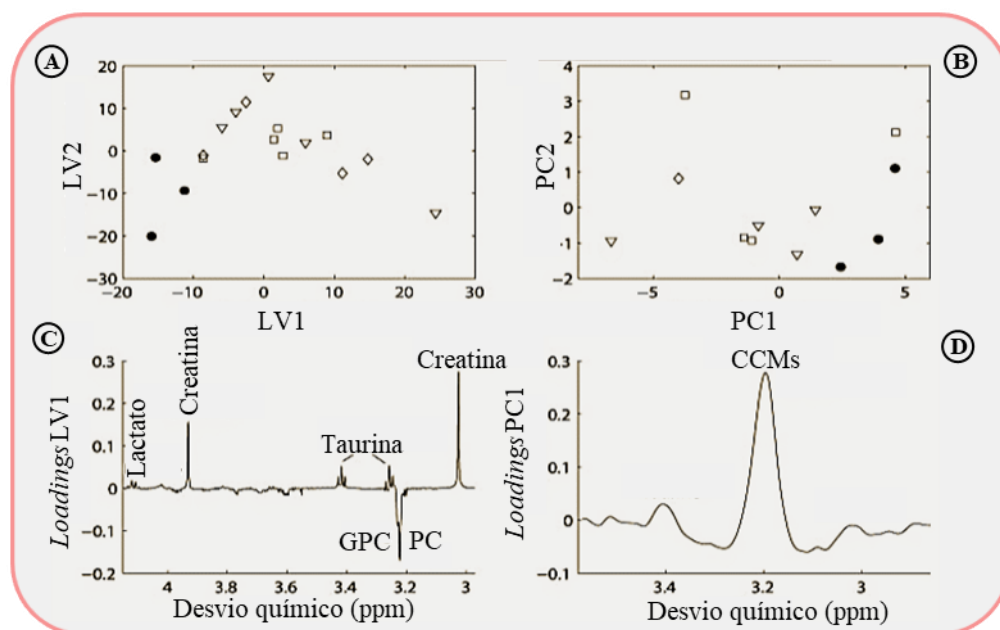


Figura 10– Diagramas de *scores* (A e C) e de *loadings* (B e D) obtidos por PLS (A e C) e PCA (B e D) dos dados recolhidos por RMN de ^1H com HRMAS e RMN de ^1H *in vivo*, respetivamente. ●, tumor controlo do modelo CDX; ▽, □, ◇, tumores do modelo CDX tratados com diferentes níveis de docetaxel; GPC, glicerosfosfocolina; PC, fosfocolina; CCMs, metabolitos que contêm colina. (Adaptado da referência [177])

1.5. Objetivos da presente tese

Através da análise de espectros de RMN de ^1H de extratos aquosos e lipídicos de tumores mamários induzidos por MPA em murganhos BALB/c, a presente tese pretendeu alcançar os seguintes objetivos:

- a)** Determinar e interpretar as principais variações metabólicas entre tumores de diferentes tipos (59-2-HI *vs.* C7-2-HI) – heterogeneidade inter-tumoral (entre tipos).
- b)** Determinar e interpretar as principais diferenças metabólicas entre tumores do mesmo tipo – heterogeneidade inter-tumoral (no mesmo tipo).
- c)** Comparar o perfil metabólico de várias porções do mesmo tumor com o intuito de analisar as variações metabólicas dentro de cada amostra – heterogeneidade intra-tumoral.
- d)** Identificar o perfil metabólico característico dos carcinomas mamários analisados e, através da sua comparação com a informação disponível na literatura, avaliar a sua representatividade em relação ao BCa humano.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras de tumores mamários em estudo

Os tumores mamários utilizados nesta tese foram gentilmente cedidos pela Dra. Claudia Lanari do Instituto de Biologia e Medicina Experimental (IBYME) de Buenos Aires. A administração de MPA a murganhos fêmea virgens da estirpe BALB/c (com 2 meses de idade) potenciou o surgimento de carcinomas ductais mamários HD que foram mantidos por transplantes subcutâneos consecutivos singênicos (Figura 11) [119,188]. Quando estes transplantes sucessivos foram realizados para murganhos sem exposição a MPA, os tumores que ocasionalmente cresceram consideraram-se HI. Assim que os tumores alcançaram 100 mm², foram excisados e armazenados a -80°C, sendo os animais sacrificados. Note-se que o cuidado e manipulação dos murganhos esteve de acordo com *guidelines* internacionais pré-estabelecidas [189]. Especificamente neste trabalho, recorreu-se a carcinomas mamários 59-2-HI (n = 4 tumores) e C7-2-HI (n = 3 tumores), ambos com crescimento independente de MPA e responsivos a diversas terapias hormonais [125].

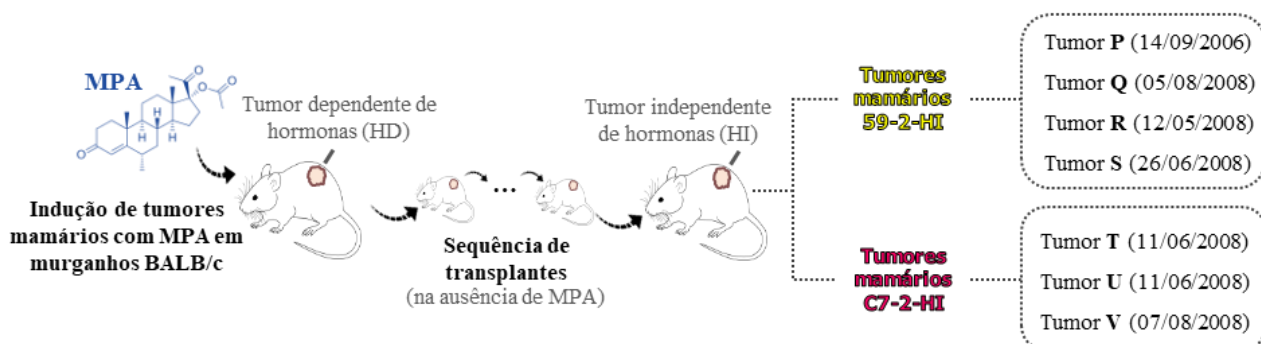


Figura 11 – Representação esquemática da indução de tumores mamários em murganhos BALB/c através da administração de medroxiprogesterona (MPA). Especifica-se a obtenção de tumores independentes de hormonas resultantes de transplantes singênicos sucessivos em murganhos sem exposição a MPA. Os transplantes sucessivos permitem que o período de latência dos tumores sem MPA diminua até igualar ao tempo de latência dos tumores com MPA. Destacam-se os tumores especificamente analisados na presente tese com a sua respetiva data de recolha.

Cada um dos tumores foi colocado numa caixa de *petri* sobre gelo seco, onde se procedeu à sua divisão em octantes com o auxílio de um bisturi. O local das incisões dependeu do formato dos tumores, apresentando-se na Figura 12 a localização espacial dos octantes do tumor P (com o formato característico da maioria dos tumores em estudo, em consequência da aquisição do formato do *ependorf* de armazenamento) e do tumor Q (com o formato mais distinto dos restantes). Para a investigação da heterogeneidade por RMN utilizaram-se os octantes com números pares (P2, P4, P6 e P8 no caso do tumor P), sendo que os ímpares (P1, P3, P5 e P7 no caso do tumor P) foram armazenados a -80°C para eventuais estudos complementares.

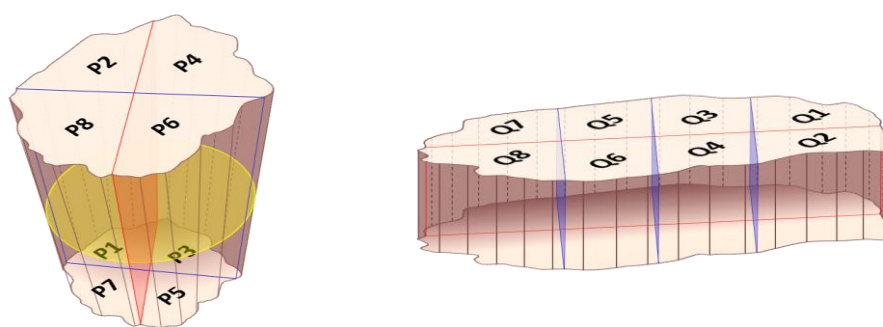


Figura 12 – Representação esquemática da localização espacial dos octantes dos tumores P e Q com destaque do local das incisões realizadas (vermelho, azul e amarelo).

2.2. Preparação de extratos de tumores

De modo a romper o tecido e maximizar a extração de metabolitos, testaram-se dois métodos distintos: **1)** recurso a almofariz de ágata para a moagem de tecido congelado em azoto líquido até à obtenção de pó, **2)** utilização de homogeneizador elétrico (*Digital Disruptor Genie®*, Scientific Industries, Inc.) com microesferas de cerâmica. Devido ao limitado número de tumores mamários disponíveis para o estudo da heterogeneidade, estes dois métodos foram inicialmente testados em tecido hepático de murganhos BALB/c. Tendo em conta a superior intensidade dos sinais nos espectros de RMN associados ao método do almofariz, este foi utilizado também nos tumores mamários. Após a moagem, cada octante tumoral em pó foi transferido para um *eppendorf* e colocado novamente em gelo seco, sendo o almofariz cuidadosamente lavado.

Para a extração de metabolitos aquosos e lipídicos recorreu-se a um método de metanol-clorofórmio-água previamente otimizado para tecidos [190]. Resumidamente, a cada *eppendorf* com os octantes tumorais adicionou-se 500 μL de solução fria de 80% metanol (Riedel-de-Haën™, Alemanha, ref. 14262-1L) e 20% água miliQ, levando-se ao vórtex por 1 minuto. Seguiu-se a adição de 400 μL de clorofórmio (Sigma-Aldrich®, USA, ref. 650471-1L) e 200 μL de água miliQ, levando-se novamente ao vórtex durante 1 minuto. Após um repouso de 10-15 minutos a 4°C, centrifugou-se (5 minutos, 8 000 rpm) e procedeu-se à separação das fases aquosa (superior) e lipídica (inferior) para os frascos adequados, com o auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, evaporaram-se os solventes aquosos no SpeedVac (~ 6h) e os lipídicos com o recurso a um jato de azoto. Os extratos foram armazenados a -80°C até serem analisados por RMN. De forma a garantir a adequação deste procedimento de extração para tumores mamários, inicialmente extraíram-se metabolitos de um tumor C7-HI.

2.3. Análise de extratos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Na Figura 13 encontra-se representado de forma simplificada o *workflow* do estudo metabólico realizado na presente tese.

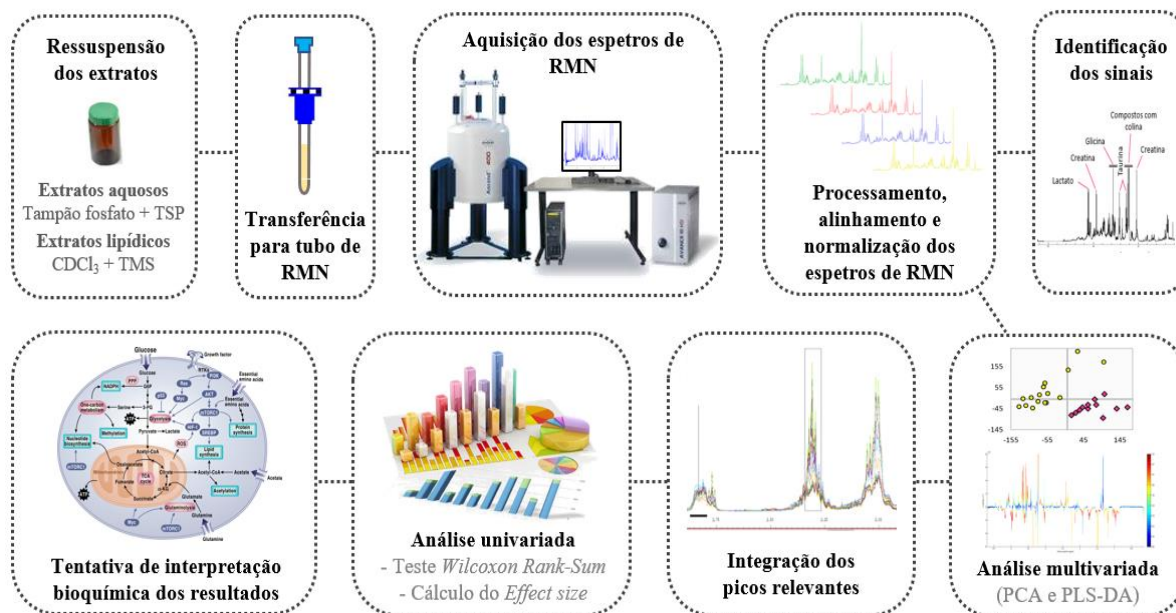


Figura 13 – *Workflow* representativo do presente estudo metabólico.

2.3.1. Aquisição dos espectros de RMN

Os extratos aquosos foram dissolvidos em 650 μL de tampão fosfato ($\text{pH} = 7.4$) preparado com Na_2HPO_4 (60 mM, Riedel-de-HaënTM, Alemanha, ref. 30427), NaH_2PO_4 (40 mM, FlukaTM, Alemanha, ref. 71496) e ácido 3-trimetilsilil propiônico (TSP, 0.1 mM) em D_2O (Sigma-Aldrich[®], USA, ref. 293040). Já os extratos lipídicos foram ressuspensos em 650 μL de clorofórmio deuterado com 0.03% de tetrametilsilano (TMS, Euriso-top[®], França, ref. D307F). Após 1 minuto no vórtex, transferiu-se 550 μL de cada amostra para um tubo de RMN de 5 mm, selando-se a tampa com Parafilm M[®] para prevenir a rápida evaporação dos solventes.

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 298 K recorrendo a um espectrómetro Bruker Avance DRX-500. Na Tabela 4 estão presentes os parâmetros de aquisição, tanto para os extratos aquosos, como para os lipídicos. Para cada amostra analisada calibrrou-se o pulso de 90° (parâmetro P1), otimizou-se a homogeneidade do campo magnético local (parâmetro de *shimming*) e confirmou-se o ganho do recetor definido automaticamente (parâmetro RGA = 203 para todas as amostras). No caso dos extratos aquosos, também se ajustou o parâmetro O1 (frequência de pressaturação da ressonância da água) de cada amostra, de modo a que a supressão do sinal da água fosse ótima. Também se registaram espectros 2D que serão alvo de análise futura.

Tabela 4 - Listagem dos parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H obtidos na presente tese.

Parâmetros de aquisição	Extratos aquosos	Extratos lipídicos
Programa de pulsos (PULPROG)	noesypr1d	zg
Número de pontos (TD)	32 768	32 768
Número de scans (NS)	512	512
Frequência de ^1H (MHz)	500.13	500.13
Janela espectral (SW em ppm)	14	14
Tempo de aquisição (AQ em s)	2.3	2.3
Tempo de espera entre <i>scans</i> consecutivos (D1 em s)	2.0	2.0
Ganho do recetor (RG)	203	203
Nº de amostras por tipo de tumor	16 (59-2-HI)	16 (59-2-HI)
	12 (C7-2-HI)	12 (C7-2-HI)

2.3.2. Processamento, alinhamento e normalização dos espectros

Após a aquisição, os espectros de RMN de ^1H foram processados recorrendo à versão 3.2 do *software* Topspin® (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha). Numa fase inicial aplicou-se um processamento automático do sinal de decaimento livre de indução (FID) através do comando **efp**, que inclui a multiplicação exponencial, a transformada de *Fourier* e a correção da fase. Posteriormente, calibraram-se os desvios químicos relativamente a referências internas (nomeadamente, TSP nos extratos aquosos e TMS nos lipídicos) e procedeu-se ao ajuste manual da fase e linha de base.

Recorrendo à versão 3.9.15 do *software* AMIX (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha), os espectros de RMN processados foram convertidos em matrizes com x colunas (correspondentes aos desvios químicos, em ppm) e y linhas (neste caso, correspondentes às 28 amostras analisadas). Na matriz dos extratos aquosos excluíram-se as regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm). Já na matriz dos extratos lipídicos, excluíram-se as regiões espectrais correspondentes aos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), do metanol (3.57-3.36 ppm) e do TMS (0.15-0.00 ppm). De forma a reduzir a variabilidade nas posições espectrais dos mesmos sinais em diferentes amostras, os espectros foram alinhados por aplicação do algoritmo ***R**ecursive **S**egment-wise **P**eak **A**lignment* (RSPA) [191] na versão R2012a do *software* Matlab (The MathWorks, Inc.). A normalização dos espectros alinhados consoante a área total de cada um (obtida com o auxílio do *software* AMIX) permitiu minimizar as diferenças entre as massas dos octantes tumorais analisados.

2.3.3. Identificação dos sinais dos espectros de RMN

Para a identificação dos sinais dos espectros de RMN característicos dos carcinomas mamários analisados, selecionou-se um exemplar típico dos extratos aquosos (octante P2) e um dos extratos lipídicos (octante V4). Tendo em conta as bases de dados *Human Metabolome DataBase* (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>), B-BIOREFCODE (incluído no *software* AMIX, Bruker) e Chenomx (Chenomx Inc), bem como a informação disponível na literatura, sugeriu-se uma proposta de identificação dos sinais presentes nos espectros selecionados.

2.4. Análise estatística

Com o intuito de estudar a influência da heterogeneidade inter-tumoral no perfil metabólico, efetuou-se a análise multivariada, tanto dos espectros de extratos aquosos, como dos lipídicos. Para tal, recorreu-se à versão 11.5 do *software* SIMCA-P (Umetrics, Umeå, Suécia), onde foi possível construir diversos modelos estatísticos. Realizou-se uma análise inicial não supervisionada por PCA incluindo todos os espectros obtidos, estando os resultados obtidos representados num diagrama de *scores*. Seguiu-se uma análise supervisionada por PLS-DA entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI. Também se avaliou a heterogeneidade entre tumores do mesmo tipo, realizando-se análises de PCA e PLS-DA. A robustez de todos os modelos PLS-DA realizados foi avaliada em termos de relevância preditiva (Q^2) [192], tendo-se considerado apenas aqueles com $Q^2 > 0.400$. Nestes modelos, para a identificação das principais variações metabólicas responsáveis pela discriminação entre os grupos, procedeu-se à construção dos respetivos diagramas de *loadings*. Para tal, em cada um dos diagramas de *scores* dos PLS-DAs selecionados, determinou-se visualmente qual das componentes LV se associava à melhor separação entre as classes em estudo. Numa folha de *Excel* (Microsoft), multiplicou-se a magnitude da componente LV selecionada em cada modelo PLS-DA pelo respetivo desvio padrão (calculado no *software* SIMCA-P 11.5). Para a obtenção dos diagramas de *loadings*, os resultados da multiplicação foram projetados com o *software* Matlab R2012a e coloridos de acordo com a importância das variáveis na projeção [193], indicada pelos valores VIP (importância da variável na projeção) no *software* SIMCA-P 11.5. Posteriormente, em cada modelo PLS-DA foram identificados os sinais (conhecidos ou não) com maior relevância, ou seja, aqueles que apresentavam tons mais quentes nos diagramas de *loadings*, sendo que estes foram confirmados pela inspeção visual dos espectros sobrepostos.

Todos os sinais considerados importantes nos diagramas de *loadings* foram integrados com o *software* AMIX 3.9.15 e normalizados consoante a área total de cada espectro. Através do *software* Python utilizaram-se as integrações normalizadas para **a)** construir *heatmaps*, **b)** avaliar a significância estatística das diferenças metabólicas individuais (teste de *Wilcoxon Rank-sum*), **c)** aplicar a correção de Bonferroni (Equação 1) de forma a avaliar a significância estatística de múltiplos

metabolitos em simultâneo associada a testes estatísticos independentes, **d)** analisar a magnitude das diferenças metabólicas observadas em cada modelo através do cálculo do ES sem (Equação 2 e 3) e com correção (Equação 4 e 5) para um reduzido número de amostras [140].

Correção de Bonferroni

$$p\text{-value} < \frac{0.05}{n^{\circ} \text{ de metabolitos}} \dots\dots\dots \text{Equação 1}$$

Cálculo do Effect size e respetivo erro

$$ES = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times SD_1^2 + (n_2 - 1) \times SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

$$\text{Erro de ES (intervalo de confiança a 95\%)} = 1.96 \times \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2} + \frac{ES^2}{2(n_1 + n_2)}} \dots\dots\dots \text{Equação 3}$$

Cálculo do Effect size corrigido para pequenas amostras e respetivo erro

$$ES_{\text{corrigido}} = 1 - \frac{3}{4(n_1 + n_2 - 2) - 1} \times ES \dots\dots\dots \text{Equação 4}$$

$$\text{Erro de } ES_{\text{corrigido}} (\text{IC}=95\%) = 1.96 \times \sqrt{\left(1 - \frac{3}{4(n_1 + n_2 - 2) - 1}\right)^2 \times \left[\frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2} + \frac{ES^2}{2(n_1 + n_2)}\right]} \dots\dots \text{Equação 5}$$

Onde **ES** é o *Effect size*, **IC** é o intervalo de confiança, **M** é a média, **n** é o número de amostras, **SD** é o desvio padrão e **SE** é o erro padrão.

Adicionalmente, com base no perfil metabólico lipídico também se calculou: **a)** o grau médio de insaturação (Equação 6); **b)** o grau médio de poliinsaturação (Equação 7); **c)** o comprimento médio da cadeia de ácidos gordos (Equação 8).

$$\text{Grau médio de insaturação} = \frac{\text{Integração}[\text{HC=CH}]}{\text{Integração}[-\text{CH}_3]} \dots\dots\dots \text{Equação 6}$$

$$\text{Grau médio de poliinsaturação} = \frac{\text{Integração}[\text{=CH-CH}_2\text{-CH=}] }{\text{Integração}[-\text{CH}_3]} \dots\dots\dots \text{Equação 7}$$

$$\text{Comprimento médio da cadeia dos FAs (expresso em grupos -CH}_2\text{)} = \frac{\text{Integração}[-\text{CH}_2]}{\text{Integração}[\text{CH}_3]} \dots\dots \text{Equação 8}$$

A avaliação da heterogeneidade intra-tumoral foi realizada principalmente através da inspeção visual dos espectros, sendo que também se calculou o desvio padrão relativo (RSD - Equação 9).

$$RSD (\%) = \frac{SD_{\text{metabolito}} \times 100}{M_{\text{metabolito}}}, \text{ onde } M \text{ é média e } SD \text{ é desvio padrão} \dots\dots\dots \text{Equação 9}$$

2.4. Avaliação do conteúdo proteico de tumores do tipo 59-2-HI

2.4.1. Extração e quantificação de proteínas totais

A extração de proteínas foi realizada em 1 ou 2 octantes de cada tumor 59-2-HI (P, Q, R e S) previamente armazenados a -80°C para eventuais testes adicionais. Recorreu-se a um almofariz para a moagem de tecido congelado em azoto líquido até à obtenção de pó. Adicionou-se tampão Wu (400 mM de NaCl, 10 mM de HEPES a pH 7.4, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EDTA e 5% de glicerol) com inibidor de protease, levando-se ao vórtex. Após um repouso de 20 minutos em gelo, centrifugou-se (12.000 rpm, 10 min, 4°C), transferiu-se o sobrenadante para um novo *eppendorf* e descartou-se o *pellet*.

A quantificação das proteínas totais realizou-se recorrendo ao kit DC™ (Bio-Rad, USA). Prepararam-se 7 diluições de um padrão de albumina de soro de bovino (0.0 mg/mL a 1.5 mg/mL) para a construção de uma curva de calibração. A cada poço da microplaca adicionou-se 5 µL de amostra ou padrão, 25 µL de reagente A' e 200 µL de reagente B. Após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente, leram-se as absorvâncias a 750 nm no dispositivo Infinite M200 (Tecan).

2.4.2. Western Blot

Colocou-se 30 µg de proteínas de cada amostra em tampão (6 mM Tris a pH 6.8, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 20% glicerol, 5% ditiotreitol) e ferveu-se durante 5 minutos. Procedeu-se à separação das proteínas das amostras e marcador de peso molecular (3 µL) através de eletroforese em gel descontínuo de poliacrilamida com 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, 200 V). Os géis de concentração da amostra e de separação da amostra apresentaram 4.0% e 7.5% de poliacrilamida, respetivamente.

Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas (25 V, 30 min) para uma membrana de nitrocelulose e os seus locais de ligação não específica foram bloqueados utilizando 5% de leite em tampão salino de Tris com Tween 20 (TBST - 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂PO₄, 0.024% KH₂PO₄, 0.1% Tween 20, pH 7.4) durante 1h. As membranas foram então lavadas com TBST e incubadas à temperatura ambiente durante 2h em TBST com o anticorpo primário (PR C-19 sc-538, Santa Cruz Biotechnology) numa concentração de 0,667 µg/mL. Este anticorpo é uma IgG que reconhece uma epítipo no terminal carboxilo do PR. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1h em TBST com anticorpo secundário anti-coelho (1:10 000) conjugado com peroxidase de rábano (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK). O sinal luminoso foi gerado com o kit WesternBright™ ECL (Advansta, San Jose, CA), seguindo-se a introdução das membranas no sistema ChemiDoc™ (Bio-Rad, USA) para a deteção dos sinais luminosos referentes às isoformas do PR.

3. Resultados e discussão

3.1. Identificação de espectros de RMN de ^1H de extratos de tumores mamários induzidos por MPA

Neste subcapítulo apresentam-se os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) característicos de extratos aquosos e lipídicos de tecido tumoral mamário induzido por MPA em murganhos BALB/c, explicando-se a abordagem realizada para a identificação dos sinais.

3.1.1. Análise de extratos aquosos

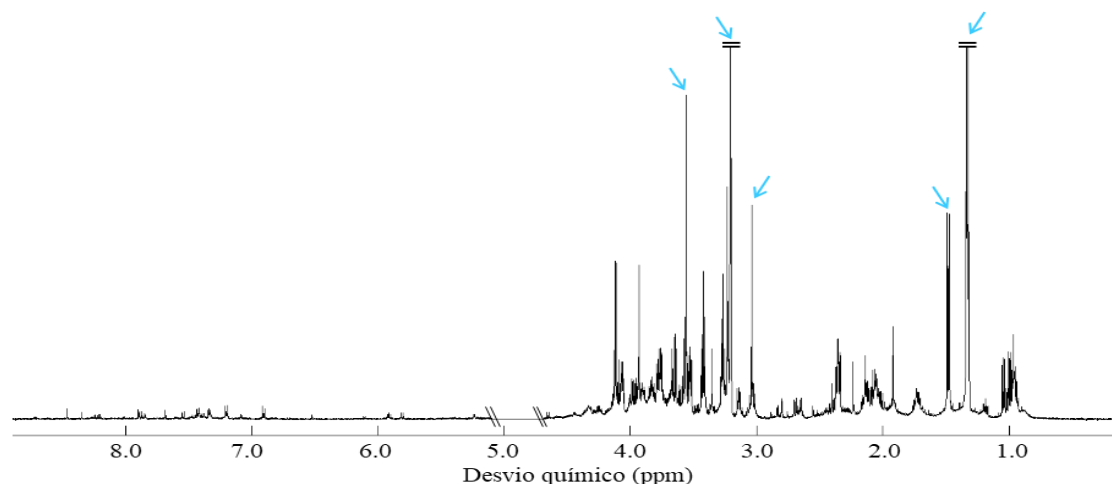
Na Figura 14a apresenta-se um espectro de RMN de ^1H típico dos extratos aquosos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir do tecido tumoral mamário. Apesar de complexo, este espectro demonstrou uma boa resolução espectral, sendo composto por um elevado número de picos associados aos metabolitos de mais baixo peso molecular. Verificou-se, no entanto, uma grande sobreposição de sinais, especialmente na região do espectro de baixo desvio químico (0.13-4.70 ppm, Figura 14b).

Para a identificação dos sinais do espectro de RMN de ^1H (Figura 14b,c) apresentada na Tabela 5 recorreu-se a bases de dados (HMDB, B-BIOREFCODE e Chenomx) e a estudos anteriores que analisaram linhas celulares de BCa (MCF-7 e MBA-MD-231) [143,194,195] e tecido tumoral mamário humano primário [141] e metastático [142]. Tal como já foi mencionado na Introdução, a maioria dos autores explorou o metaboloma tumoral mamário analisando tecido intacto (por RMN com HRMAS) ou extratos aquosos de tumores obtidos pelo método do ácido perclórico (PCAc) [141–143]. Contudo, apenas alguns estudos apresentaram uma identificação detalhada dos sinais característicos dos espectros de RMN do BCa, destacando-se o trabalho de Sitter *et al.* [141], onde se analisou tecido intacto e extratos aquosos (obtidos por PCAc) de carcinomas ductais mamários de pacientes. Apesar de ter sido publicado em 2002, este trabalho é ainda hoje um dos mais completos na identificação dos metabolitos presentes em tumores mamários, sendo que a maioria dos restantes estudos apenas incidiu na região de baixo desvio químico do espectro de RMN de ^1H (< 5 ppm [196]) ou em sinais específicos (principalmente nos compostos derivados de colina [173,197]).

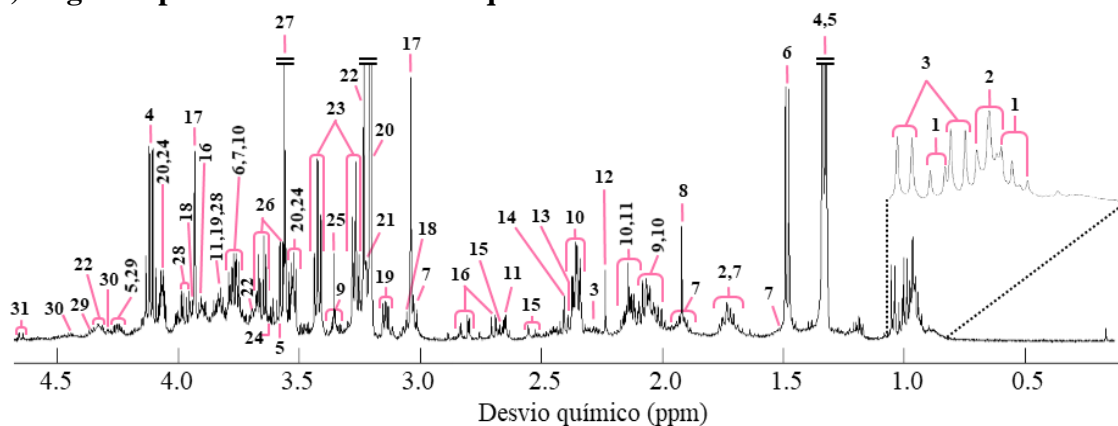
Entre os 39 metabolitos hidrofílicos identificados na presente tese, os picos mais intensos provieram de lactato, alanina, creatina, compostos de colina e glicina. Na região 0.13-4.70 ppm (Figura 14b) observaram-se sinais de diversos aminoácidos essenciais (Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Met) e não essenciais (Ala, Pro, Glu, Asp, Tau, Gly, Ser), ácidos orgânicos (lactato, acetato, piruvato, succinato, citrato), compostos de colina (colina, PC, GPC), poliálcoois (*myo*- e *scyllo*-inositol) e outros metabolitos (acetona, creatina, fosfocreatina, etanolamina, glicerol e glucose). Já na região 5.20-9.00 ppm (Figura 14c) identificaram-se aminoácidos essenciais (His, Phe) e não essenciais (Tyr), bases azotadas (uracilo e hipoxantina), nucleósidos (adenosina/inosina e uridina) e ácidos orgânicos

(formato, fumarato).

a) Espectro completo



b) Região espectral de baixo desvio químico



c) Região espectral de alto desvio químico

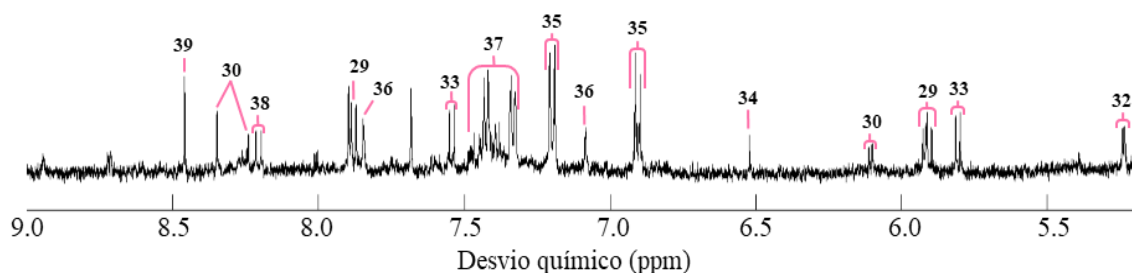


Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de extratos aquosos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir de tecido tumoral mamário induzido por MPA em murganinhos. O espectro apresentado refere-se ao octante tumoral P2, uma das quatro porções do tumor P analisadas por RMN no presente trabalho (P2, P4, P6 e P8). **a)** espectro completo (0.13-9.00 ppm) com exclusão das regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm); **b,c)** regiões espectrais de baixo (**b**, 0.13-4.70 ppm) e alto desvio químico (**c**, 5.20-9.00 ppm), com os respectivos sinais numerados segundo a identificação presente na Tabela 5. As setas azuis (\rightarrow) destacam os sinais mais intensos.

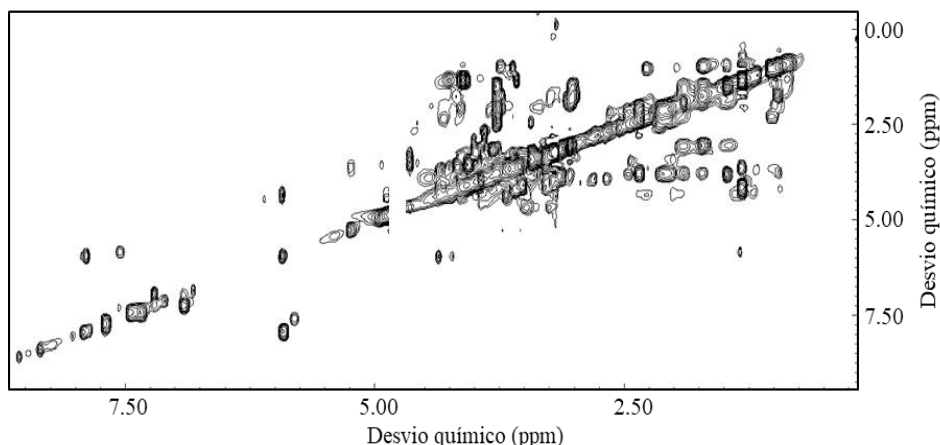
Tabela 5 - Lista de metabolitos identificados no espectro de RMN de ^1H (Figura 14b,c) referentes ao extrato aquoso do octante tumoral P2. Os metabolitos ordenaram-se por ordem crescente do seu sinal com menor desvio químico. Em cada metabolito, refere-se o desvio químico (em ppm) e multiplicidade dos hidrogénios a negrito e sublinhados (H). **s**, singleto; **d**, dupletto; **t**, tripleto; **q**, quarteto; **dd**, duplo dupletto; **dt**, duplo tripleto; **m**, multi pleto; **br**, sinal largo (de “*broad*”).

Nº	Metabolito	δ ^1H / ppm (multiplicidade, atribuição do sinal)
1	Isoleucina	0.94 (t, δ - <u>CH₃</u>), 1.02 (d, γ - <u>CH₃</u>)
2	Leucina	0.96 (d, δ' - <u>CH₃</u>), 0.97 (d, δ - <u>CH₃</u>), 1.72 (m, γ - <u>CH</u>)
3	Valina	0.99 (d, γ - <u>CH₃</u>), 1.05 (d, γ' - <u>CH₃</u>), 2.29 (m, β - <u>CH</u>)
4	Lactato	1.33 (d, <u>CH₃</u>), 4.11 (q, <u>CH</u>)
5	Treonina	1.33 (d, γ - <u>CH₃</u>), 3.58 (d, β - <u>CH</u>), 4.25 (dd, α - <u>CH</u>)
6	Alanina	1.48 (d, β - <u>CH₃</u>), 3.77 (q, α - <u>CH</u>)
7	Lisina	1.53 (γ - <u>CH₂</u> , t), 1.72 (m, δ - <u>CH₂</u>), 1.92 (m, β - <u>CH₂</u>), 3.02 (ϵ - <u>CH₂</u> , t), 3.77 (t, α - <u>CH</u>)
8	Acetato	1.92 (s, β - <u>CH₃</u>)
9	Prolina	2.03 (m, 3- <u>CH₂</u> /4- <u>CH₂</u>), 3.35 (dt, 2- <u>CH₂</u>)
10	Glutamato	2.05 (dt, β - <u>CH₂</u>), 2.13 (m, β' - <u>CH₂</u>), 2.36 (m, γ - <u>CH₂</u>), 3.77 (t, α - <u>CH</u>)
11	Metionina	2.13 (m, β - <u>CH₂</u> / ϵ - <u>CH₃</u>), 2.65 (t, γ - <u>CH₂</u>), 3.83 (dd, α - <u>CH</u>)
12	Acetona	2.24 (s, α - <u>CH₃</u>)
13	Piruvato	2.39 (s, <u>CH₃</u>)
14	Succinato	2.41 (s, α - <u>CH₂</u> / β - <u>CH₂</u>)
15	Citrato	2.52 (d, α - <u>CH</u> / β - <u>CH</u>), 2.67 (d, α' - <u>CH</u> / β' - <u>CH</u>)
16	Aspartato	2.70 (dd, β - <u>CH</u>), 2.82 (dd, β' - <u>CH</u>), 3.90 (dd, α - <u>CH</u>)
17	Creatina	3.04 (s, N- <u>CH₃</u>), 3.93 (s, N- <u>CH₂</u>)
18	Fosfocreatina	3.06 (s, <u>CH₃</u>), 3.94 (s, <u>CH₂</u>)
19	Etanolamina	3.15 (t, <u>CH₂</u> -NH ₂), 3.83 (t, <u>CH₂</u> -OH)
20	Colina	3.21 (s, N(<u>CH₃</u>) ₃), 3.53 (m, β - <u>CH₂</u> -N), 4.07 (m, α - <u>CH₂</u> -OH)
21	Fosfocolina	3.22 (s, N(<u>CH₃</u>) ₃), 3.60 (m, N- <u>CH₂</u>), 4.17 (m, PO ₃ - <u>CH₂</u>)
22	Glicerofosfocolina	3.23 (s, N(<u>CH₃</u>) ₃), 3.68 (m, β' - <u>CH₂</u> -N(CH ₃) ₃), 4.33 (m, α' - <u>CH₂</u> -PO ₄ ⁻)
23	Taurina	3.26 (t, <u>CH₂</u> -SO ₃), 3.42 (t, NH ₂ - <u>CH₂</u>)
24	myo-inositol	3.28 (t, 5- <u>CH</u>), 3.53 (dd, 1- <u>CH</u> /3- <u>CH</u>), 3.63 (t, 4- <u>CH</u> /6- <u>CH</u>), 4.07 (t, 2- <u>CH</u>)
25	scyllo-inositol	3.36 (s, <u>CH</u>)
26	Glicerol	3.55 (dd, 1- <u>CH₂</u> /3- <u>CH₂</u>), 3.63 (dd, 1- <u>CH₂</u> /3- <u>CH₂</u>)
27	Glicina	3.56 (s, α - <u>CH₂</u>)
28	Serina	3.84 (dd, α - <u>CH</u>), 3.95 (dd, β - <u>CH₂</u>), 3.99 (dd, β' - <u>CH₂</u>)
29	Uridina	4.23 (t, 3'- <u>CH</u> da ribose), 4.36 (t, 2'- <u>CH</u> da ribose), 5.89 (d, 1'- <u>CH</u> da ribose), 5.90 (d, 5- <u>CH</u> do anel), 7.86 (d, 6- <u>CH</u> do anel)
30	Adenosina/Inosina	4.28 (q, 4'- <u>CH</u> da ribose), 4.44 (dd, 3'- <u>CH</u> da ribose), 6.10 (d, 1'- <u>CH</u> da ribose), 8.24 (s, 2- <u>CH</u> do anel), 8.35 (s, 8- <u>CH</u> do anel)
31	β -Glucose	4.65 (d, 1- <u>CH</u>)
32	α -Glucose	5.24 (d, 1- <u>CH</u>)
33	Uracilo	5.81 (d, 5- <u>CH</u> do anel), 7.52 (d, 6- <u>CH</u> do anel)
34	Fumarato	6.52 (s, <u>HC=CH</u>)
35	Tirosina	6.91 (d, 3- <u>CH</u> /5- <u>H</u> do anel), 7.20 (d, 2- <u>CH</u> /6- <u>H</u> do anel)
36	Histidina	7.08 (s, 4- <u>CH</u> do anel), 7.85 (s, 2- <u>CH</u>)
37	Fenilalanina	7.33 (m, 2- <u>CH</u> /6- <u>CH</u> do anel), 7.39 (m, 4- <u>CH</u> do anel), 7.43 (m, 3- <u>CH</u> /5- <u>CH</u> do anel)
38	Hipoxantina	8.20 (s, 2- <u>CH</u> do anel), 8.22 (s, 8- <u>CH</u>)
39	Formato	8.46 (s, HO- <u>HC</u> =O)

Na Figura 15a mostra-se um espectro de RMN 2D de espectroscopia de correlação total (TO-CSY) ^1H - ^1H , neste caso referente ao octante V8 do tumor V. Por questões de tempo, não se

considerou esta informação para a identificação dos metabolitos apresentada na Tabela 5. Ainda assim, exemplificou-se na Figura 15b a abordagem realizada para a identificação dos picos da lisina. Num futuro próximo, pretende-se recorrer a este e outros espectros 2D não só para confirmar a presença dos metabolitos listados na Tabela 5, mas também para auxiliar na identificação de picos desconhecidos.

a) Espectro 2D TOCSY completo



b) Expansão do espectro com identificação dos sinais da lisina e respetiva estrutura

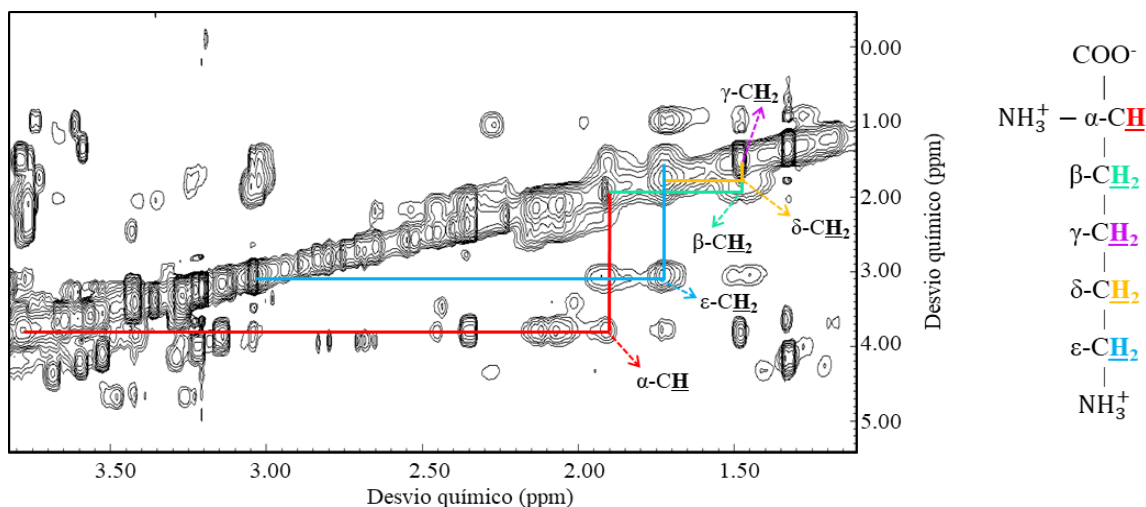


Figura 15 – Espectro de RMN 2D TOCSY ^1H - ^1H (500 MHz) de extratos aquosos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir de tecido tumoral mamário induzido por MPA em murganhos. O espectro apresentado refere-se ao octante V8, uma das quatro porções do tumor V analisadas neste trabalho (V2, V4, V6 e V8). **a)** espectro completo; **b)** expansão do espectro com identificação dos sinais da lisina e respetiva estrutura. **TOCSY**, espectroscopia de correlação total.

Na Figura 16 apresentam-se as regiões espectrais de baixo (Figura 16a) e alto desvio químico (Figura 16b) adquiridas a partir de tumores mamários de murganhos (resultantes de extratos aquosos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água na presente tese) e de pacientes (resultantes de tecido intacto e de extratos aquosos obtidos pelo método do PCAc no estudo de Sitter *et al.* [141]). Numa primeira análise visual verificou-se que o espectro obtido nesta tese demonstrou grande

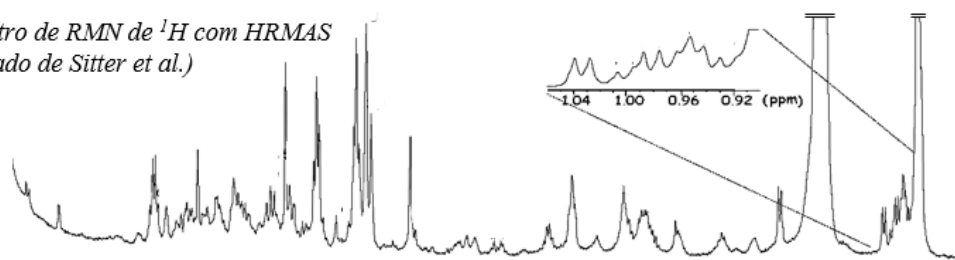
similaridade aos obtidos por Sitter *et al.* [141], observando-se as maiores diferenças na região > 8.0 ppm (localização típica de diversos sinais de nucleótidos e derivados). Mais especificamente, constatou-se que: **a)** alguns metabolitos (principalmente acetona, citrato, metionina, etanolamina, glicerol, hipoxantina, serina e U_{1.19/m}) não constaram no perfil metabólico de BCa humano descrito por Sitter *et al.* [141]; **b)** vários compostos reconhecidos em tumores mamários de pacientes (asparagina, fosfoetanolamina, glutamina e nucleótidos) não se observaram no espectro desta tese apresentado na Figura 16a,b. Importa referir que este espectro pertencia a um dos tumores do tipo 59-2-HI, sendo que nos tumores C7-2-HI (T, U e V) também foi possível identificar glutamina e asparagina.

Apesar de vários estudos já terem analisado espectros de RMN de ¹H de tumores mamários de murganhos, estes são geralmente mais direcionados para regiões espectrais específicas [197]. Na verdade, além dos trabalhos de investigação realizados em pacientes, apenas os estudos em linhas celulares de BCa realizaram identificações mais detalhadas dos sinais dos espectros de RMN. Comparando o perfil metabólico das células MCF-7 (as mais comumente utilizadas em estudos metabólicos de BCa) descrito por Nittoli *et al.* [194] com aquele obtido na presente tese, verificou-se que: **a)** apenas apresentaram 15 metabolitos em comum (Ala, Asp, colina, formato, glucose, Glu, Gly, His, Ile, lactate, Leu, Lys, Pro, Thr, Val), sendo estes os mesmos compostos partilhados entre as células MCF-7 e os tumores mamários humanos analisados por Sitter *et al.* [141]; **b)** diversos compostos observados por Nittoli *et al.* [194] (ATP/ADP, hidroxiprolina, gama aminobutirato, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, citrulina, cisteína, glutatona) não se identificaram na presente tese, sendo que estes (exceto o ATP/ADP) também estiveram ausentes no perfil metabólico de BCa humano [141]. Assim, relativamente às células MCF-7, o perfil metabólico do modelo animal utilizado na presente tese mostrou-se mais representativo do BCa humano [141,194].

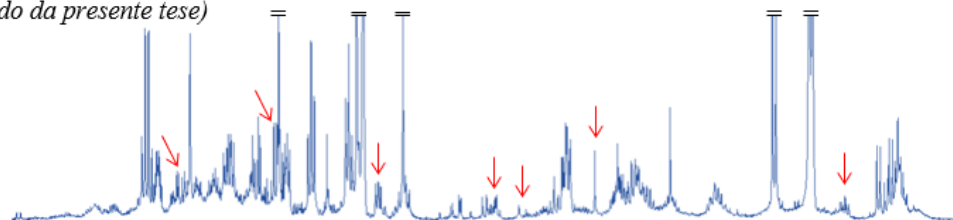
Contrariamente a ambos os estudos acima mencionados [141,194], a presença de nucleótidos foi impercetível em todos os espectros obtidos na presente tese. Este aspeto pode estar relacionado com diversos fatores: **a)** os solventes aqui utilizados possivelmente não terem sido os mais adequados para a extração destes metabolitos, no entanto, outros estudos metabólicos em linhas celulares (incluindo células de BCa) e tecidos detetaram nucleótidos com métodos de extração idênticos ao desta tese [198–200]; **b)** a degradação enzimática dos nucleótidos, por exemplo, devido ao eventual atraso no armazenamento das biópsias aquando da sua extração. Contudo, num estudo metabólico recente em tecido mamário tumoral verificou-se que um atraso no congelamento entre 30 min e 120 min apenas alterava de forma significativa os níveis de ascorbato, colina, creatina e glutatona, não se relatando quaisquer diferenças em relação ao teor de nucleótidos [201]. Outra possibilidade seria o elevado tempo de armazenamento das amostras a -80°C, sendo que não se encontraram estudos que explorassem o efeito do tempo de armazenamento especificamente nos níveis de nucleótidos de tumores mamários.

a) Região espectral de baixo desvio químico

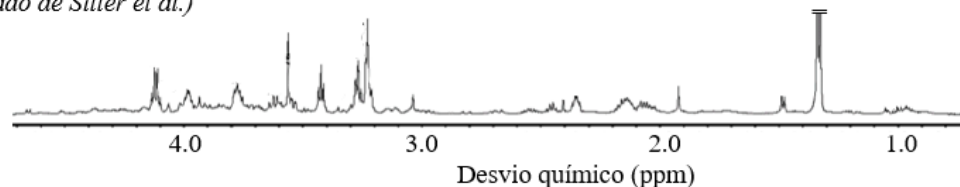
i) Espectro de RMN de ^1H com HRMAS
(adaptado de Sitter *et al.*)



ii) Espectro de RMN de ^1H de extratos aquosos obtidos pelo método do clorofórmio-metanol-água
(resultado da presente tese)

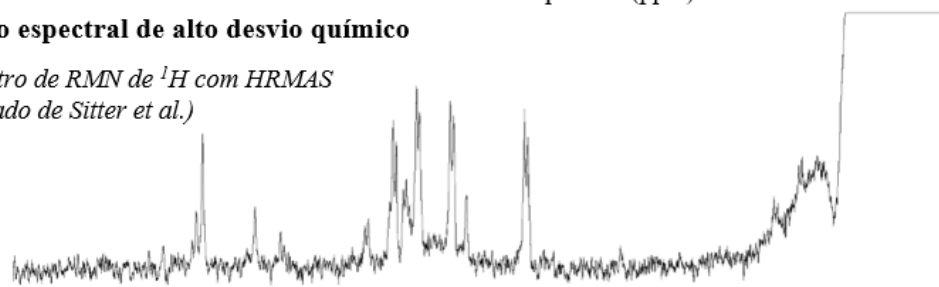


iii) Espectro de RMN de ^1H de extratos aquosos obtidos pelo método do ácido perclórico
(adaptado de Sitter *et al.*)

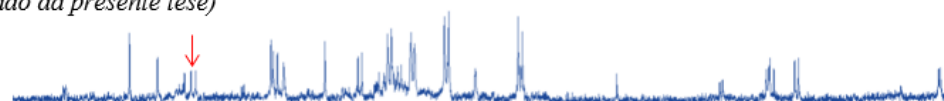


b) Região espectral de alto desvio químico

i) Espectro de RMN de ^1H com HRMAS
(adaptado de Sitter *et al.*)



ii) Espectro de RMN de ^1H de extratos aquosos obtidos pelo método do clorofórmio-metanol-água
(resultado da presente tese)



iii) Espectro de RMN de ^1H de extratos aquosos obtidos pelo método do ácido perclórico
(adaptado de Sitter *et al.*)

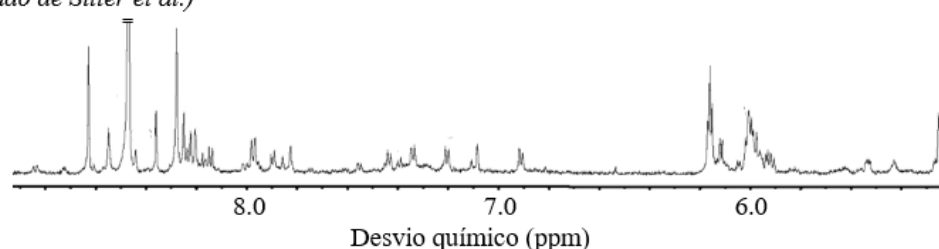
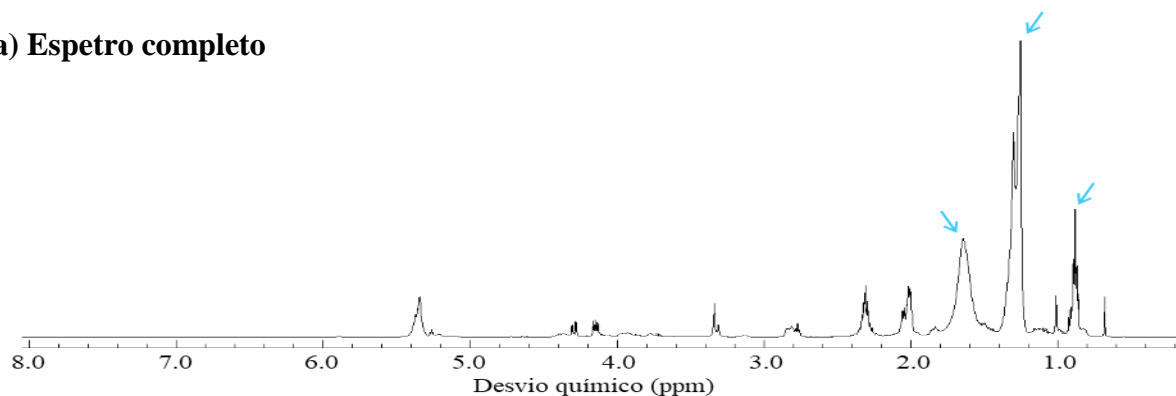


Figura 16 – Regiões de baixo (a) e alto desvio químico (b) dos espectros de RMN de ^1H : i) com HRMAS de tecido tumoral mamário de pacientes (estudo de Sitter *et al.* [141]), ii) de extratos aquosos de tumores mamários de murganhos obtidos na presente tese pelo método de metanol-clorofórmio-água, iii) de extratos aquosos de tecido tumoral mamário de pacientes obtidos pelo método do ácido perclórico (estudo de Sitter *et al.* [141]). O espectro apresentado a azul refere-se ao octante tumoral P2, uma das quatro porções do tumor P analisadas no presente trabalho. As setas vermelhas (\rightarrow) destacam os metabolitos identificados na presente tese que não foram identificados no estudo de Sitter *et al.* [141].

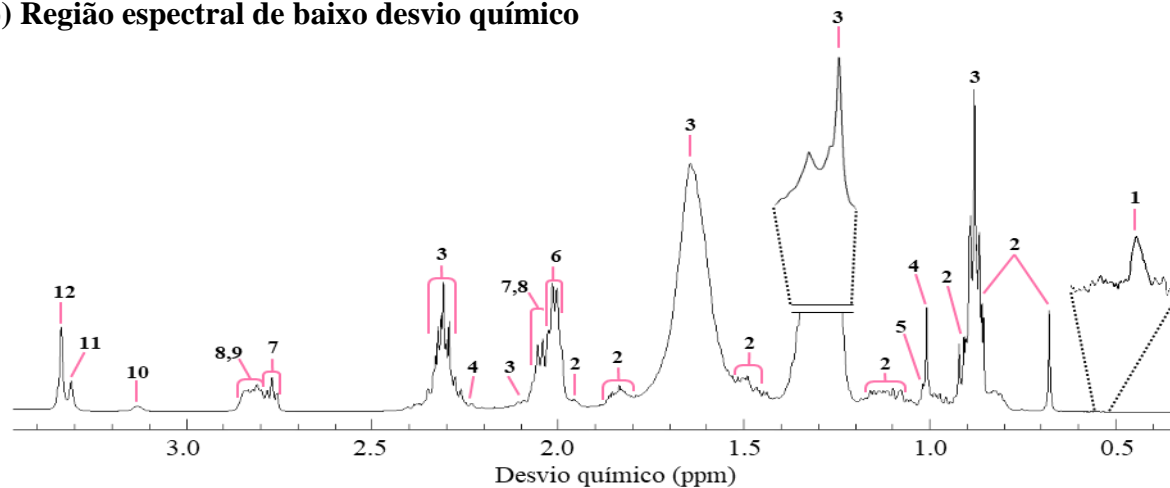
3.1.2. Análise de extratos lipídicos

Na Figura 17a pode observar-se um espectro de RMN de ^1H representativo dos extratos lipídicos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir do tecido tumoral mamário analisado na presente tese. Comparativamente com os espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos, estes espectros demonstraram sinais claramente mais largos, refletindo o elevado peso molecular dos lípidos. Verificou-se ainda alguma sobreposição de sinais na região do espectro de baixo desvio químico (0.15-2.50 ppm, Figura 17b).

a) Espectro completo



b) Região espectral de baixo desvio químico



c) Região espectral de alto desvio químico

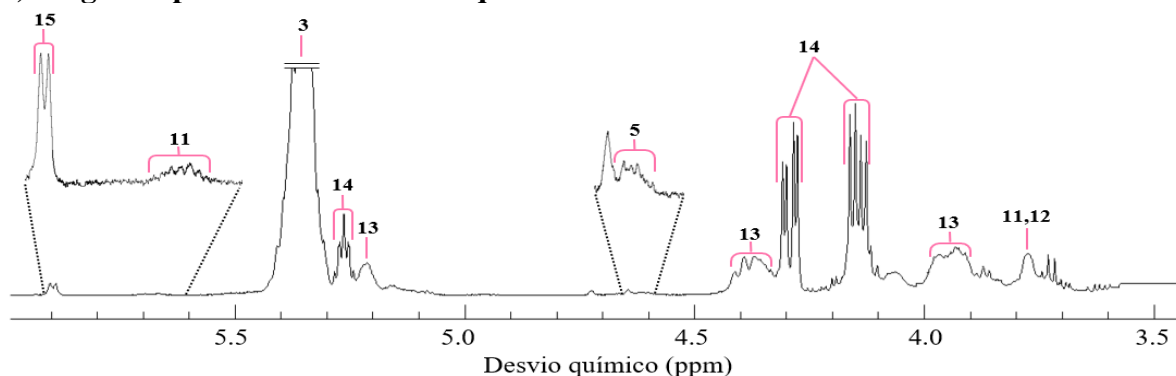


Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de extratos lipídicos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir de tumores mamários induzidos por MPA em murganhos. O espectro refere-se ao octante tumoral V4, uma das quatro porções do tumor V analisadas neste trabalho (V2, V4, V6 e V8). **a)** espectro completo (0.15-8.00 ppm) sem as regiões dos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), metanol (3.57-3.36 ppm) e TMS (0.15-0.00 ppm). **b,c)** regiões de baixo (**b**, 0.15-3.40 ppm) e alto desvio químico (**c**, 3.40-6.00 ppm), com os sinais numerados segundo a Tabela 6. As setas azuis (→) destacam os sinais mais intensos.

Considerando a inexistência de estudos onde recorressem a RMN de ^1H para analisar extratos lipídicos de tecido tumoral mamário (de pacientes ou modelos animais), a identificação dos sinais do espectro apresentada na Tabela 6 baseou-se em bases de dados (HMDB e B-BIOREFCODE) e em trabalhos referentes a plasma/soro sanguíneo [202,203] e linhas celulares de BCa [204].

Tabela 6 - Lista de metabolitos identificados no espectro de RMN de ^1H (Figura 17b,c) referentes ao extrato lipídico do octante tumoral V4. Os metabolitos ordenaram-se por ordem crescente do seu sinal com menor desvio químico. Em cada metabolito, refere-se o desvio químico (em ppm) e multiplicidade dos hidrogénios a negrito e sublinhados (H). s, singleto; d, duplete; t, tripleto; q, quarteto; dd, duplo duplete; dt, duplo tripleto; m, multiplete; br, sinal largo (de “*broad*”).

Nº	Metabolito	δ ^1H ppm (multiplicidade, atribuição do sinal)
1	Total 7-lathosterol	0.55 (18- <u>CH</u> ₃ , s)
2	Colesterol total	0.68 (18- <u>CH</u> ₃ , s), 0.86 (26- <u>CH</u> ₃ , d), 0.87 (27- <u>CH</u> ₃ , d), 0.91 (21- <u>CH</u> ₃ , d), 1.12 (múltiplos prótons de colesterol, m), 1.48 (múltiplos prótons de colesterol, m), 1.84 (múltiplos prótons de colesterol, m), 1.96 (7- <u>CH</u> ₂ /8- <u>CH</u> , br)
3	Ácidos Gordos	0.88 (<u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n , t), 1.25 ((<u>CH</u> ₂) _n , m), 1.30 (=CH- <u>CH</u> ₂ -CH ₂ (CH ₂)-, m), 1.64 (- <u>CH</u> ₂ -CH ₂ -CO-, m), 2.10 (- <u>CH</u> ₂ -CH=CH-, m), 2.30 (- <u>CH</u> ₂ -CO, m), 5.35 (- <u>H</u> C= <u>CH</u> -, m)
4	Colesterol livre	1.01 (19- <u>CH</u> ₃ , s), 3.53 (3- <u>CH</u> , m)
5	Colesterol esterificado	1.02 (19- <u>CH</u> ₃ , s), 4.61 (3- <u>CH</u> , m)
6	Ácido oleico (18:1, ω -9)	2.01 (-CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -CH=, m)
7	Ácido linoleico (18:2, ω -6)	2.05 (-CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -CH=, m), 2.77 (=CH- <u>CH</u> ₂ -CH=, t)
8	Ácido araquidónico (20:4, ω -6)	2.05 (-CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -CH=, m), 2.82 (=CH- <u>CH</u> ₂ -CH=, m)
9	Ácido docosahexaenóico (22:6, ω -3)	2.82 (=CH- <u>CH</u> ₂ -CH=, m)
10	Fosfatidiletanolamina	3.14 (-CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -NH ₂ , br)
11	Esfingomielina	3.30 (-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ , s), 3.77 (N- <u>CH</u> ₂ , br), 5.68 (-CH ₂ - <u>CH</u> =CH-CHOH-, m)
12	Fosfatidilcolina	3.33 (-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ , s), 3.77 (N- <u>CH</u> ₂ , br)
13	Glicerofosfolípidos	3.95 (3- <u>CH</u> ₂ do glicerol, m), 4.37 (PO-(1- <u>CH</u> ₂) do glicerol, m), 5.21 (2- <u>CH</u> do glicerol, m)
14	Triglicerídeos	4.14 (1- <u>CH</u> ₂ /3- <u>CH</u> ₂ do glicerol, dd), 4.29 (1'- <u>CH</u> ₂ /3'- <u>CH</u> ₂ do glicerol, dd), 5.26 (2- <u>CH</u> do glicerol, m)
15	Plasmalogénio	5.90 (O- <u>CH</u> =CH, d)

À semelhança dos extratos aquosos, também nos extratos lipídicos se obteve um espectro 2D TOCSY ^1H - ^1H (Figura 18), neste caso referente ao octante Q2 do tumor Q. Mais uma vez, por questões de tempo, não se considerou esta informação para a identificação dos metabolitos apresentada na Tabela 6. Ainda assim, exemplifica-se na Figura 18 a abordagem realizada para a identificação de alguns dos picos pertencentes aos FAs.

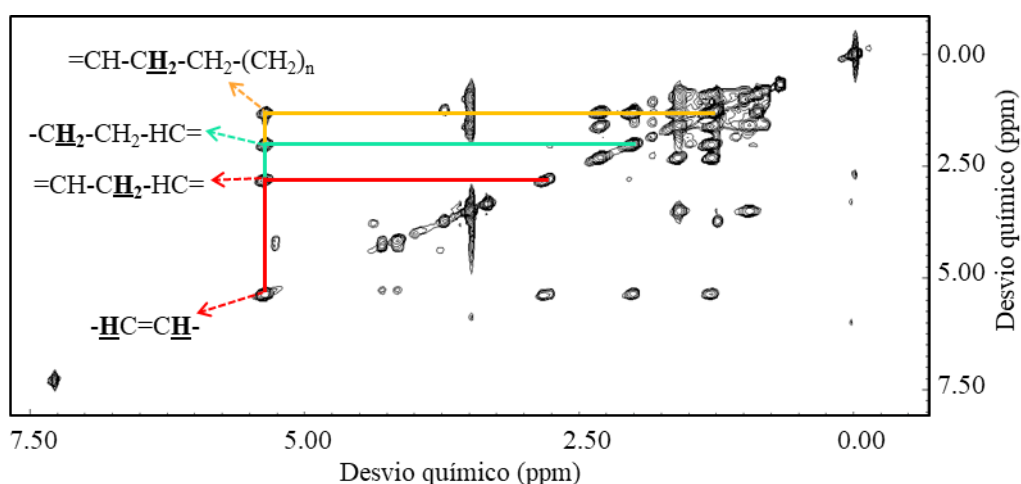


Figura 18 – Espectro de RMN 2D TOCSY ^1H - ^1H (500 MHz) de extratos lipídicos obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água a partir de tecido tumoral mamário induzido por MPA em murganhos. Exemplificou-se a identificação de alguns dos sinais dos ácidos gordos. O espectro apresentado refere-se ao octante Q2, uma das quatro porções do tumor Q analisadas neste trabalho.

Na Figura 19a-f apresenta-se a estrutura básica da maioria dos compostos listados na Tabela 6, nomeadamente colesterol livre (Figura 19a), ácidos gordos (ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico e ácido docosahexanoico - Figura 19b), esfingomiéline (Figura 19c), diacilglicerofosfolípidos (PtdCho e fosfatidiletanolamina - Figura 19d), plasmalogénios (Figura 19e) e triglicerídeos (Figura 19f).

Tal como se pode observar na Figura 17b e Tabela 6, os sinais presentes na região 0.15-1.2 ppm resultaram essencialmente da ressonância de ^1H dos grupos terminais metilo ($-\text{CH}_3$). Aos 1.25 ppm identificaram-se os ^1H dos grupos metileno ($-\text{CH}_2$) da cadeia hidrocarbonada dos FAs (sinal mais intenso do espectro). A maioria dos restantes sinais correspondeu a grupos metileno em diferentes ambientes químicos, sendo que a sua proximidade a ligações duplas e/ou a elementos eletronegativos (como O) contribuiu para desvios químicos superiores. Uma observação mais detalhada do espectro permitiu constatar que os picos típicos do colesterol total se identificaram na região 0.6-2.0 ppm, reconhecendo-se alguns sinais específicos do colesterol livre (1.01 e 3.53 ppm) e esterificado (1.02 e 4.61 ppm). À exceção do sinal correspondente às ligações duplas (5.35 ppm), todos os picos dos FAs se encontraram na zona 0.8-2.3 ppm. A região 3.1-5.9 ppm (Figura 17b,c) incluiu os sinais dos fosfolípidos, sendo que: **a)** os ^1H do glicerol dos diacilglicerofosfolípidos apresentaram picos a 3.95, 4.37 e 5.21 ppm; **b)** a colina (presente tanto na esfingomiéline como na PtdCho) exibiu sinais correspondentes aos ^1H dos grupos metilo da trimetilamina (~3.3 ppm) e do grupo metileno adjacente (3.77 ppm); **c)** o sinal do ^1H do grupo metínico da ligação dupla da esfingosina da esfingomiéline identificou-se a 5.68 ppm; **d)** a etanolamina da fosfatidiletanolamina teve um sinal a 3.14 ppm referente aos ^1H do grupo metileno adjacente ao seu grupo amina; **e)** o ^1H do grupo metínico adjacente ao grupo éter característico da posição sn-1 do plasmalogénio foi responsável pelo sinal aos 5.90 ppm. A região 4.1-5.3 ppm incluiu os sinais do glicerol dos triglicerídeos.

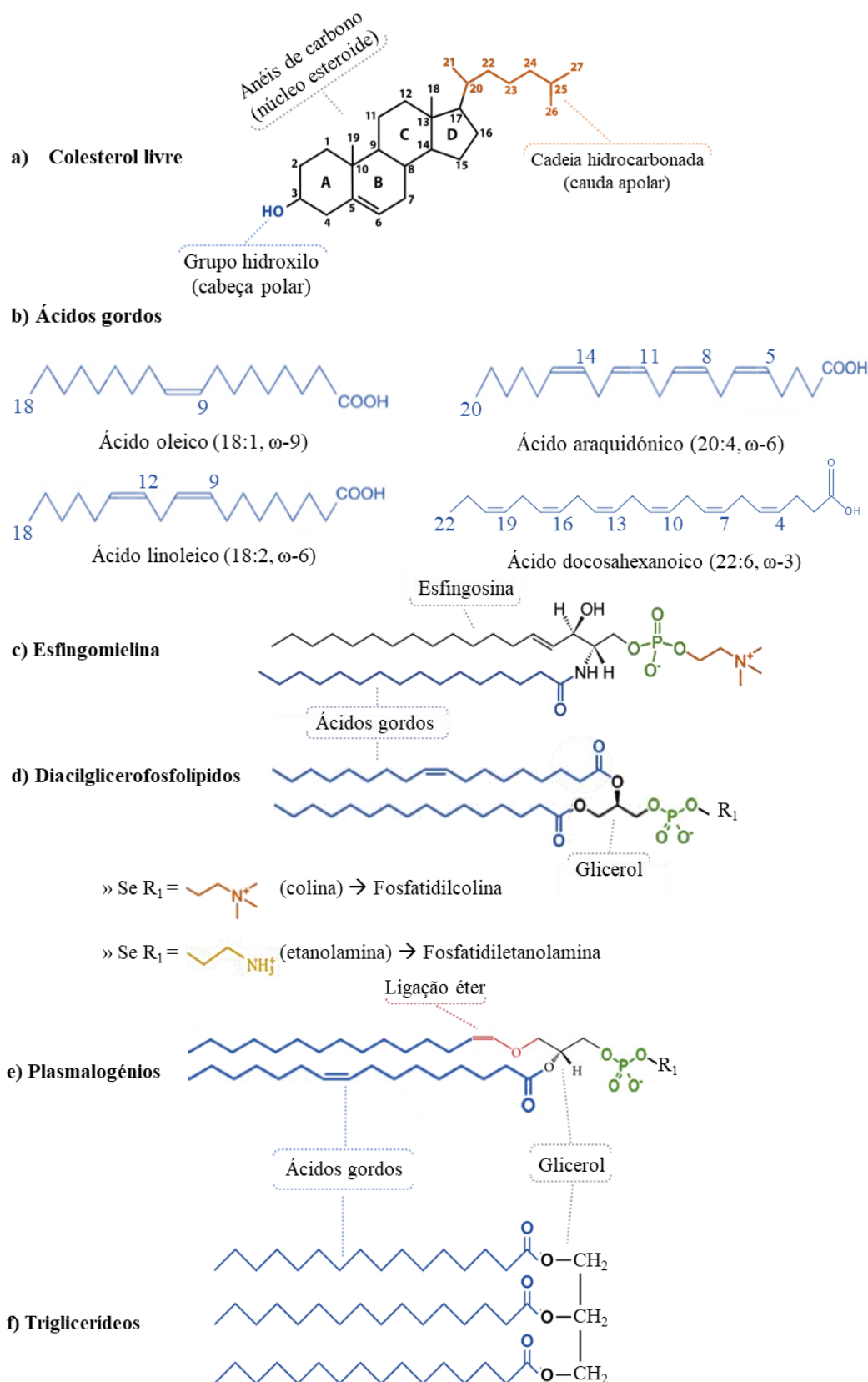


Figura 19 – Estrutura básica de **a)** colesterol livre, **b)** ácidos gordos (nomeadamente, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico e ácido docosahexaicoico), **c)** esfingomielina, **d)** diacilglicerofosfolípidos (nomeadamente, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), **e)** plasmalogenios e **f)** triglicerídeos. R_1 , grupo substituinte.

Devido à inexistência de estudos que analisassem extratos lipídicos de tecido tumoral mamário (de pacientes ou modelos animais), apenas se comparou o espectro obtido nesta tese (Figura 20a) com um espectro típico de linhas celulares de BCa (Figura 20b). Constatou-se que o perfil de metabolitos lipofílicos de tumores mamários do modelo animal em estudo foi semelhante ao obtido a partir de células MDA-MB-231 no trabalho de Sterin *et al.* [204]. Contudo, no espectro apresentado pelos autores desse estudo, a identificação dos metabolitos não foi realizada de forma tão detalhada como na presente tese, dificultando a comparação entre os resultados. Foi evidente que um dos sinais correspondentes aos FAs (observado a 1.64 ppm) apresentou: **a)** uma intensidade e largura claramente superiores na presente tese, em relação ao trabalho elaborado por Sterin *et al.* [204]; **b)** uma intensidade desproporcionalmente elevada comparativamente com os restantes sinais dos FAs. Pensa-se que tal se deva à sobreposição deste sinal com água residual, sendo que ambos apresentam o mesmo desvio químico em CDCl_3 [205].

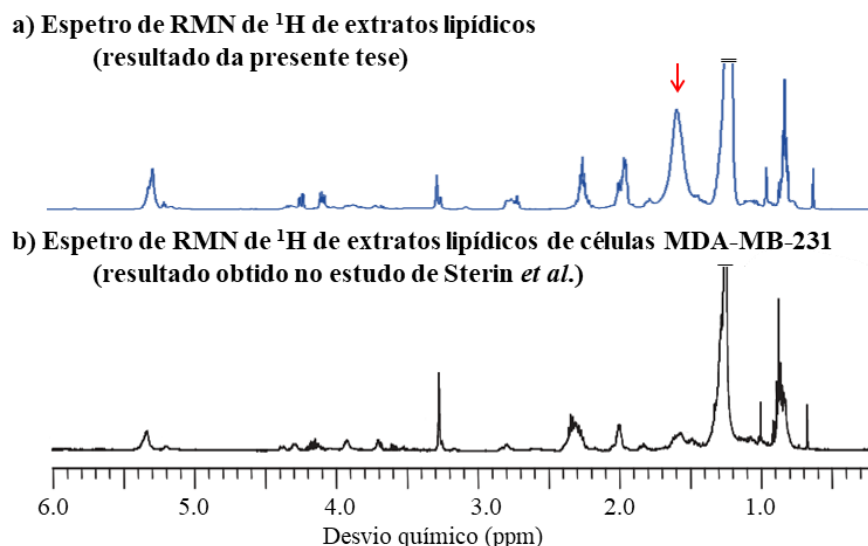


Figura 20 – Espectro de RMN de ^1H de extratos lipídicos **(a)** dos tumores mamários da presente tese (a azul) e **(b)** de células de cancro da mama MDA-MB-231 obtido no estudo de Sterin *et al.* [204] (a preto). A seta vermelha (\rightarrow) salienta a principal diferença visual entre os espectros. O espectro a azul refere-se ao octante tumoral V4, uma das quatro porções do tumor V analisadas por RMN no presente trabalho.

3.2. Avaliação do perfil metabólico entre tumores (heterogeneidade inter-tumoral)

3.2.1. Comparação entre diferentes tipos de tumores: 59-2-HI e C7-2-HI

3.2.1.1. Análise de extratos aquosos

Com o intuito de discriminar o perfil metabólico dos tumores 59-2-HI (P, Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V), começou por se realizar uma PCA nos espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos. O diagrama de *scores* resultante desta análise estatística não supervisionada (Figura 21a) evidenciou um agrupamento dos diferentes tipos de tumores ao longo da primeira componente principal (PC1),

sugerindo uma variação metabólica significativa entre os tipos tumorais. Contudo, três das quatro frações do tumor P analisadas (octantes tumorais P4, P6 e P8 - Figura 12) separaram-se claramente dos restantes tumores do tipo 59-2-HI (Q, R e S) ao longo de PC1 e PC2, indicando que o tumor P apresentava um perfil metabólico distinto dos tumores Q, R e S. Com a análise supervisionada por PLS-DA (Figura 21b) obteve-se um modelo estatístico muito robusto com uma elevada relevância preditiva ($Q^2 = 0.852$). Aqui, a discriminação entre os tipos de tumor foi ainda mais notória, especialmente ao nível da primeira variável latente (LV1) do gráfico de *scores*. Ainda assim, o octante P6 continuou claramente distante dos restantes octantes do tumor P e dos outros tumores 59-2-HI.

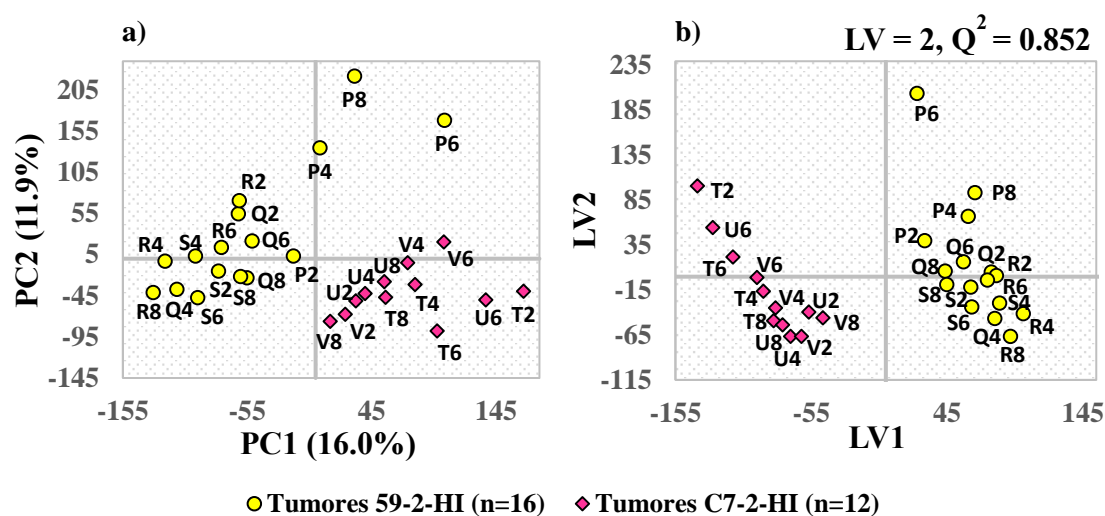


Figura 21 – Diagrama de *scores* de PCA (a) e PLS-DA (b) dos espetros de RMN de ^1H dos extratos aquosos dos tumores mamários P, Q, R e S do tipo 59-2-HI (●) e T, U e V do tipo C7-2-HI (◆). Estes modelos estatísticos não incluíram as regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm). PC1/PC2, componentes principais 1 e 2; LV1/LV2, variáveis latentes 1 e 2; Q^2 , coeficiente de relevância preditiva.

Para a identificação das principais variações metabólicas responsáveis pela separação entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI, procedeu-se à análise dos respetivos diagramas de *loadings* de LV1 da PLS-DA (Figura 22a,b) coloridos de acordo com a importância das variáveis na projeção (valores VIP). Identificaram-se os sinais com maior relevância para a variação entre as classes, ou seja, aqueles que apresentavam tons mais quentes. Os sinais positivos e negativos do diagrama de *loadings* corresponderam, respetivamente, aos metabolitos aumentados nos tumores 59-2-HI (agrupados na região positiva de LV1 dos *scores*) e C7-2-HI (agrupados na região negativa de LV1 dos *scores*). Assim, comparativamente com os tumores C7-2-HI, os tumores 59-2-HI apresentaram níveis: **a)** mais elevados de alguns ácidos orgânicos (piruvato, succinato e citrato), bases azotadas (uracilo e hipoxantina), nucleósidos (adenosina/inosina), outros compostos conhecidos (glutamato, colina, glicerol) e $\text{U}_{7.89/\text{s}}$ (nomenclatura adotada para os sinais de metabolitos desconhecidos, sendo neste caso específico representativa de um singlete localizado a 7.89 ppm); **b)** mais baixos de vários

aminoácidos essenciais (Leu, Lys, Phe e Thr) e não essenciais (Asn e Ser), polióis (myo- e scyllo-inositol), outros metabolitos conhecidos (fosfocolina e uridina) e desconhecidos ($U_{0.14/s}$, $U_{0.88/br}$, $U_{1.19/m}$, $U_{1.30/s}$, $U_{1.45/d}$, $U_{2.75/s}$ e $U_{4.01/m}$). Todas estas alterações metabólicas foram confirmadas pela inspeção visual dos espectros sobrepostos como se encontra exemplificado na Figura 23.

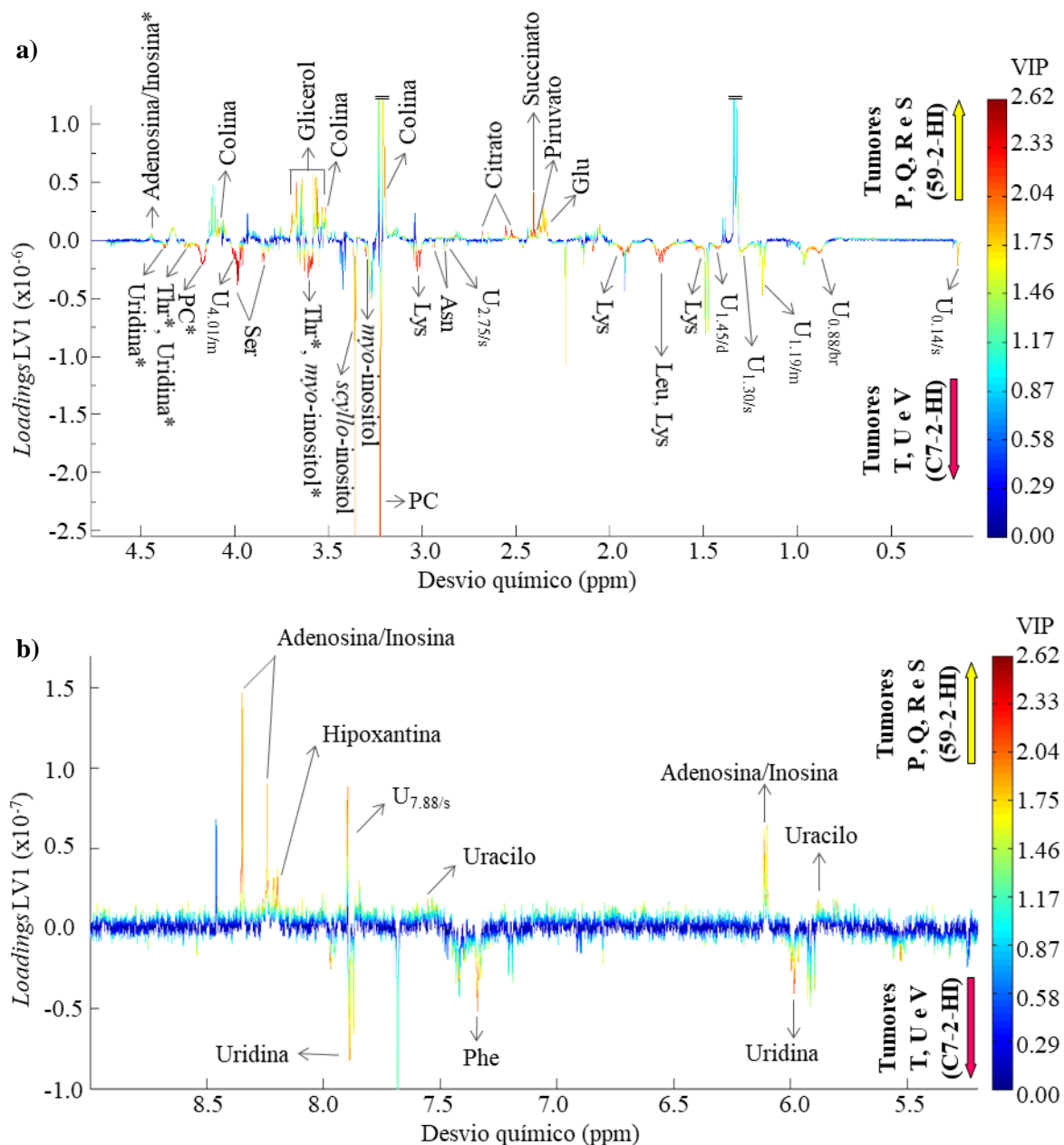


Figura 22– Diagrama de *loadings* de LV1 do modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos aquosos dos tumores mamários P, Q, R e S (tipo 59-2-HI) com os T, U e V (tipo C7-2-HI), representando-se as regiões espectrais de baixo (a, 0.13-4.70 ppm) e alto desvio químico (b, 5.10-9.00 ppm). A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja), destacando-se com um asterisco (*) aqueles que se encontravam numa zona de muita sobreposição. Os metabolitos aumentados nos tumores dos tipos 59-2-HI e C7-2-HI identificaram-se, respetivamente, nas regiões positiva e negativa do eixo Loadings LV1. GPC, glicerofosfocolina; PC, fosfocolina.

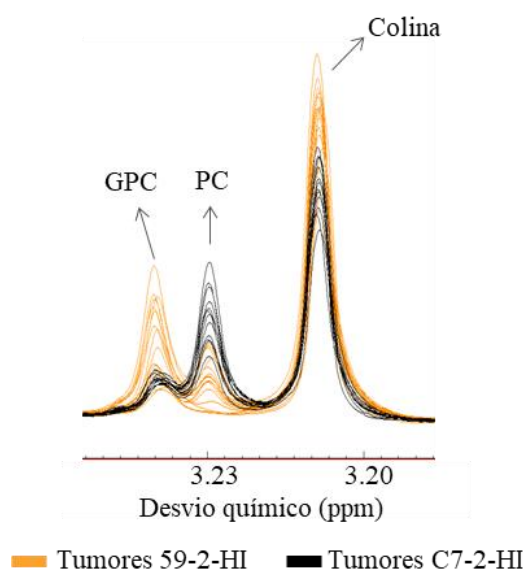


Figura 23 - Confirmação visual nos espectros de RMN de ^1H dos principais metabolitos que variaram entre os tumores mamários do tipo 59-2-HI (laranja) e do tipo C7-2-HI (preto). A título de exemplo mostra-se a região espectral da colina, fosfocolina (PC) e glicerofosfocolina (GPC).

A magnitude das diferenças metabólicas entre os tumores P, Q, R e S (59-2-HI) e os tumores T, U e V (C7-2-HI) calculou-se através do ES (Equação 2 e 3) [140], apresentando-se na Tabela 7 apenas os metabolitos com $|\text{ES}| > 0.50$ e erro de ES $< 75\%$. Tendo em conta que, para um reduzido número de elementos por grupo o ES pode ser sobrestimado, também se calculou este parâmetro corrigido para um pequeno número de amostras ($\text{ES}_{\text{corrigido}}$, Equação 4 e 5), garantindo-se que todos os metabolitos também apresentaram um $|\text{ES}_{\text{corrigido}}| > 0.50$.

A significância estatística da diferença entre as médias das integrações normalizadas de cada metabolito foi avaliada através do teste de *Wilcoxon Rank-sum* (análise não paramétrica de amostras independentes) [206]. Este teste é particularmente útil em estudos com menos de 30 elementos por grupo (o que se verifica no presente trabalho), já que a esta escala os testes de normalidade induzem frequentemente o recurso erróneo a testes estatísticos paramétricos [207]. Nesta tese, um $p\text{-value} < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo (Tabela 7) admitindo-se, portanto, 5% de probabilidade da variação observada ser aleatória. Como a comparação entre tumores 59-2-HI e C7-2-HI implicava a análise de múltiplos metabolitos em simultâneo através de testes estatísticos independentes (neste caso, 31 metabolitos com $p\text{-value} < 0.05$), aumentar-se-ia a probabilidade de falsos positivos. Para evitar esta situação, aplicou-se a correção de *Bonferroni* (Equação 1) [208], segundo a qual apenas os $p\text{-values} < \frac{0.05}{31} = 1.61 \times 10^{-3}$ foram considerados estatisticamente significativos, de forma a ter em conta os 31 metabolitos simultaneamente, mantendo 5% de probabilidade de eventos aleatórios causarem a variação observada. Ainda assim, é importante referir que a correção de *Bonferroni* é um método extremamente conservativo, aumentando bastante a probabilidade de falsos negativos [209].

Tabela 7 - Metabolitos hidrofílicos estatisticamente diferentes entre os tumores P, Q, R e S do tipo 59-2-HI (n=16 octantes) e os tumores T, U e V do tipo C7-2-HI (n=12 octantes). Os metabolitos foram ordenados consoante o desvio químico, sendo que apenas se considerou um dos picos constituintes do sistema de *spins* característico de cada metabolito. **a)** o “*Effect size*” (ES) e respetivo erro calcularam-se segundo as equações 2 e 3 [140], apresentando-se apenas os metabolitos com $|ES| > 0.50$ e um erro de $ES < 75\%$. Os metabolitos com ES positivo e negativo encontraram-se aumentados, respetivamente, nos tumores 59-2-HI e C7-2-HI. **b)** valores de *p-value* obtidos com o teste *Wilcoxon Rank-sum*, apresentando-se apenas os que corresponderam a uma diferença estatisticamente significativa num intervalo de confiança de 95% ($p\text{-value} < 0.05$). **c)** valores de *p-value* que deixaram de ser estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um *cutoff* de $\frac{0.05}{31} = 1.61 \times 10^{-3}$.

$\delta \text{ }^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	<i>Effect size</i> (ES) ^a	<i>p-value</i> ^b
0.97 (d)	Leucina	-1.22 ± 0.81	$1.39 \times 10^{-2} \text{ c}$
1.48 (d)	Alanina	-1.23 ± 0.81	$8.14 \times 10^{-3} \text{ c}$
1.92 (m)	Lisina	-2.38 ± 0.97	2.94×10^{-5}
2.24 (s)	Acetona	-1.47 ± 0.84	$2.55 \times 10^{-3} \text{ c}$
2.36 (m)	Glutamato	1.84 ± 0.89	2.45×10^{-4}
2.39 (s)	Piruvato	1.63 ± 0.86	1.41×10^{-4}
2.41 (s)	Succinato	3.22 ± 1.13	8.32×10^{-6}
2.52 (d)	Citrato	4.30 ± 1.35	1.03×10^{-5}
2.84 (dd)	Asparagina	-1.45 ± 0.84	$1.87 \times 10^{-3} \text{ c}$
3.21 (s)	Colina	1.77 ± 0.88	7.02×10^{-4}
3.22 (s)	Fosfocolina	-2.41 ± 0.98	4.40×10^{-5}
2.23 (s)	GPC	$1.22 \pm 0.81 \text{ c}$	$1.07 \times 10^{-2} \text{ c}$
3.36 (s)	<i>scyllo</i> -inositol	-1.89 ± 0.90	2.93×10^{-4}
3.55 (dd)	Glicerol	1.69 ± 0.87	4.18×10^{-4}
3.63 (t)	<i>myo</i> -inositol	-3.18 ± 1.12	1.95×10^{-5}
3.95 (dd)	Serina	-5.50 ± 1.62	8.32×10^{-6}
4.11 (q)	Lactato	1.10 ± 0.80	$9.33 \times 10^{-3} \text{ c}$
4.25 (dd)	Treonina	-2.03 ± 0.92	3.51×10^{-4}
5.81 (d)	Uracilo	1.89 ± 0.90	1.41×10^{-4}
6.52(s)	Fumarato	1.63 ± 0.86	4.18×10^{-4}
7.33 (m)	Fenilalanina	-1.69 ± 0.87	1.16×10^{-3}
7.86 (d)	Uridina	-1.48 ± 0.84	$1.59 \times 10^{-3} \text{ c}$
8.22 (s)	Hipoxantina	1.69 ± 0.87	5.92×10^{-4}
8.35 (s)	Adenosina/Inosina	1.98 ± 0.91	2.04×10^{-4}
0.14 (s)	U _{0.14/s}	-1.80 ± 0.88	7.95×10^{-5}
0.88 (br)	U _{0.88/br}	-1.56 ± 0.85	9.80×10^{-4}
1.19 (m)	U _{1.19/m}	-1.26 ± 0.82	$6.16 \times 10^{-3} \text{ c}$
1.30 (s)	U _{1.30/s}	-1.61 ± 0.86	4.18×10^{-4}
1.45 (d)	U _{1.45/d}	-1.08 ± 0.80	$8.14 \times 10^{-3} \text{ c}$
2.81 (t)	U _{2.81/t}	1.13 ± 0.81	5.37×10^{-5}
7.68 (s)	U _{7.68/s}	-1.07 ± 0.80	$7.09 \times 10^{-3} \text{ c}$

À exceção de alguns compostos desconhecidos (U_{2.75/s}, U_{4.01/m} e U_{7.89/s}), a grande maioria das diferenças metabólicas destacadas no diagrama de *loadings* (Figura 22a,b) apresentaram relevância estatística (Tabela 7). Além disso, alguns dos metabolitos a tons menos quentes no diagrama de *loadings* também apresentaram relevância estatística. Entre estes, enquanto que a Ala, acetona e U_{7.68/s}

estiveram em níveis superiores nos tumores C7-2-HI, o fumarato, GPC, lactato e $U_{2.81/t}$ encontraram-se mais elevados nos tumores 59-2-HI.

Visto que o tumor P pareceu possuir um perfil metabólico distinto dos restantes tumores do tipo 59-2-HI, a sua inclusão nas análises estatísticas poderá mascarar diferenças metabólicas importantes entre os 2 tipos de tumores. Assim, decidiu-se fazer uma segunda análise excluindo este tumor para averiguar a existência de alterações adicionais entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI. A aplicação da PCA (Figura 24a) e PLS-DA (Figura 24b) confirmou a separação evidente entre os tipos de tumores ao longo da PC1 e LV1, respetivamente. A exclusão do tumor P melhorou ligeiramente a robustez da PLS-DA, sendo que o Q^2 passou de 0.852 para 0.892. Tanto na PCA, como na PLS-DA, se notou uma maior dispersão dos tumores T, U e V comparativamente com os tumores Q, R e S, levando a crer que o tipo 59-2-HI (exceto o P) apresentavam um perfil de metabolitos hidrofílicos mais semelhante entre tumores e entre octantes do mesmo tumor. Este aspeto será explorado adiante com a análise de perfis metabólicos de tumores do mesmo tipo (subcapítulo 3.2.2.) e de octantes do mesmo tumor (subcapítulo 3.3.).

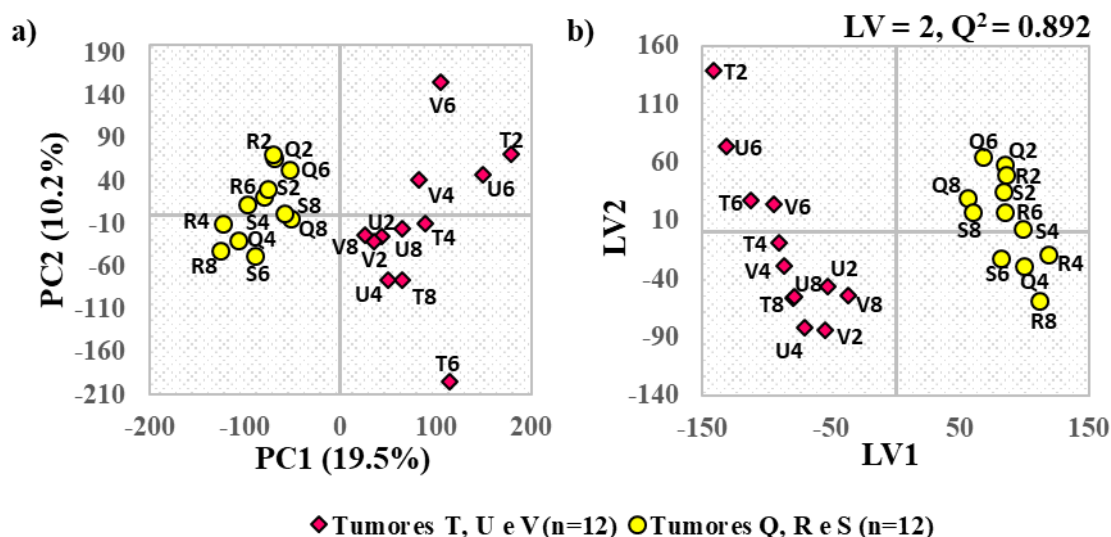


Figura 24 – Diagrama de *scores* de PCA (a) e PLS-DA (b) dos espetros de RMN de 1H dos extratos aquosos dos tumores mamários Q, R e S do tipo 59-2-HI (●) e T, U e V do tipo C7-2-HI (◆). Estes modelos estatísticos não incluíram as regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q^2** , coeficiente de relevância preditiva.

No diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA (Figura 25a,b), verificou-se que a maioria das diferenças metabólicas observadas no modelo anterior se tornaram mais acentuadas (sinais com tons mais vermelhos). Relativamente aos metabolitos estatisticamente relevantes no modelo anterior (P, Q, R e S vs. T, U e V), neste diagrama de *loadings* (Q, R e S vs. T, U e V) observou-se que novos compostos se tornaram importantes na separação dos grupos (como a Ile, Pro, Tyr, Val, etanolamina e $U_{3.12/s}$ – possivelmente mascarados no modelo anterior pela contribuição do tumor P), deixando outros de ser relevantes (lactato, fumarato e $U_{7.68/s}$ - provavelmente evidenciados no modelo anterior

53

Na Tabela 8 apresentam-se somente os metabolitos hidrofílicos cujos níveis variaram com $p\text{-values} < 0.05$ (teste de *Wilcoxon Rank-sum*), $|ES| > 0.50$, erro de ES $< 75\%$ e que não estiveram incluídos na tabela anterior. Constatou-se que, à exceção do lactato e $U_{7.68/s}$, todos as variações estatisticamente relevantes no modelo anterior (P, Q, R e S vs. T, U e V) permaneceram-no neste modelo. Verificou-se também que todas as novas diferenças metabólicas destacadas no diagrama de *loadings* (Figura 25a,b) e resultantes da exclusão do tumor P apresentaram relevância estatística. Averiguou-se ainda que, relativamente aos tumores T, U e V, os tumores Q, R e S exibiram níveis significativamente mais elevados de creatina e mais baixos de metionina.

Tabela 8 - Metabolitos hidrofílicos estatisticamente diferentes entre os tumores Q, R e S do tipo 59-2-HI (n=12 octantes) e os tumores T, U e V do tipo C7-2-HI (n=12 octantes) e que não foram incluídos na Tabela 9. **a,b,c)** Informação detalhada na Tabela 7. Neste caso, a correção de *Bonferroni* teve um *cutoff* de $\frac{0.05}{38} = 1.32 \times 10^{-3}$. ³. Note-se que apesar de só serem listados 9 metabolitos, foram 38 os que variaram significativamente entre os tipos de tumores.

$\delta \text{ } ^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	p-value ^b
1.02 (d)	Isoleucina	-2.76 ± 1.12	8.64×10^{-5}
1.05 (d)	Valina	-2.92 ± 1.15	6.78×10^{-5}
2.03 (m)	Prolina	-2.77 ± 1.12	1.10×10^{-4}
2.46 (m)	Glutamina	-1.54 ± 0.91	$3.89 \times 10^{-3} \text{ c}$
2.65 (t)	Metionina	-1.57 ± 0.92	$1.82 \times 10^{-3} \text{ c}$
3.15 (t)	Etanolamina	2.00 ± 0.98	2.20×10^{-4}
3.93 (s)	Creatina	1.18 ± 0.87	$2.68 \times 10^{-3} \text{ c}$
6.91 (d)	Tirosina	-2.04 ± 0.99	2.76×10^{-4}
3.12 (s)	$U_{3.12/s}$	1.95 ± 0.97	9.99×10^{-4}

De forma a facilitar a comparação entre os tumores 59-2-HI (Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V), construiu-se um *heatmap* (Figura 26) representativo das integrações normalizadas de todos os metabolitos considerados estatisticamente importantes. O facto das integrações de todos os metabolitos estarem representadas na mesma escala levou a que compostos com níveis mais elevados (principalmente derivados de colina, alanina e glutamato) tornassem menos evidentes as diferenças associadas a compostos menos abundantes (por exemplo, metionina, asparagina, fumarato e hipoxantina). Apesar disso e de uma certa variabilidade entre tumores do mesmo tipo e intra-tumoral, a maioria das diferenças metabólicas já referidas puderam observar-se, sendo perceptível a diferença de tons entre os tumores 59-2-HI (Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V), principalmente em termos de citrato, compostos de colina, glicerol, serina e alguns compostos desconhecidos (como $U_{0.88/br}$ e $U_{1.19/m}$).

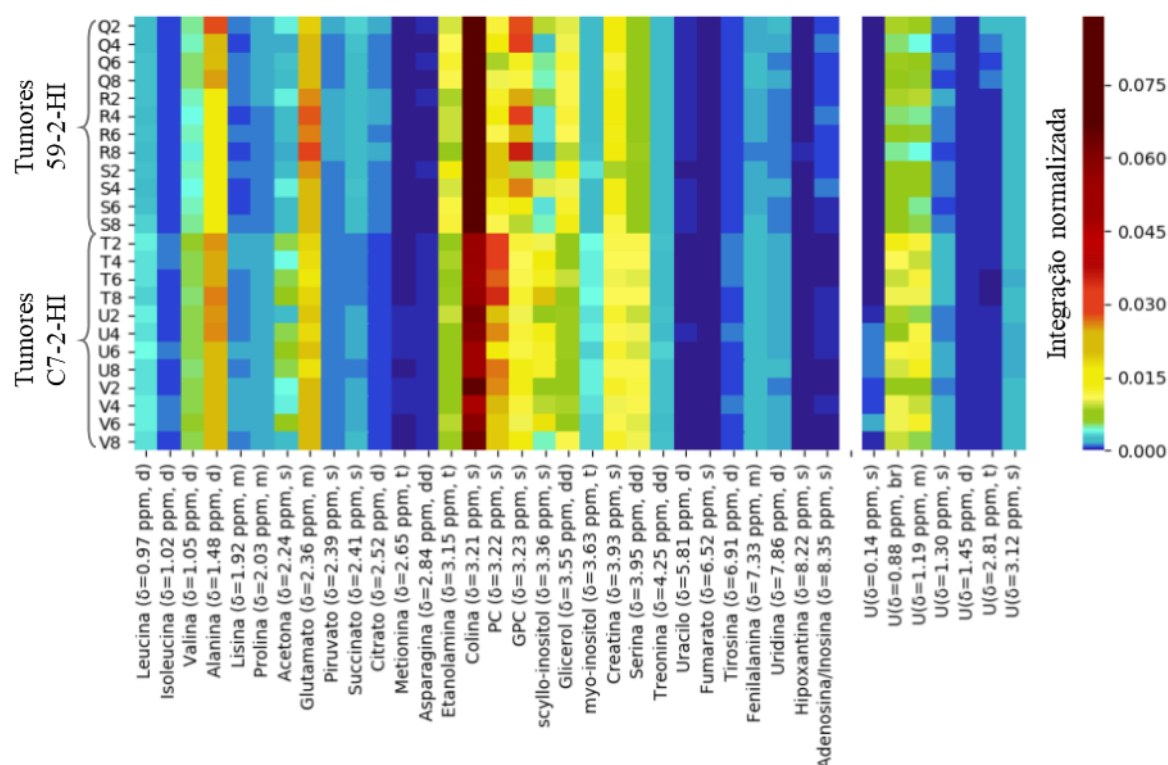


Figura 26 - Heatmap representativo das quantidades relativas dos principais metabolitos hidrofílicos que diferem entre os tumores do tipo 59-2-HI (Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V). Nas linhas e colunas apresentam-se, respectivamente, os octantes tumorais analisados por RMN de ^1H e os metabolitos seleccionados. A escala de cores foi atribuída da integração normalizada máxima (vermelho escuro) à mínima (azul escuro). **br**, sinal largo (de “broad”); **d**, duplete; **dd**, duplo duplete; **m**, multiplete; **s**, singleto; **t**, tripleto.

3.2.1.2. Análise de extratos lipídicos

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos lipídicos foram analisados de forma semelhante aos aquosos, tentando-se comparar o perfil metabólico dos tumores do tipo 59-2-HI (P, Q, R e S) com os do tipo C7-2-HI (T, U e V). Neste caso, a PCA apenas revelou uma ténue separação entre as classes ao longo de PC1, verificando-se uma grande dispersão nos dois tipos de tumores (Figura 27a). Apesar da discriminação entre os grupos ter melhorado com a análise de PLS-DA (Figura 27b) ao longo de LV1, a robustez do modelo resultante foi apenas satisfatória ($Q^2 = 0.444$). Isto significa que o metaboloma lipídico é menos alterado entre os tipos de tumores em estudo do que o metaboloma polar.

Deste modo, facilmente se compreende que no diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA (Figura 28) poucos metabolitos se tenham mostrado importantes na discriminação entre as classes. Ainda assim, verificou-se que, relativamente aos tumores do tipo C7-2-HI, os tumores 59-2-HI se caracterizaram por níveis mais elevados de glicerofosfolípidos totais, esfingomielina, plasmalogénio e alguns metabolitos desconhecidos ($U_{4.21/\text{dd}}$, $U_{5.47/\text{br}}$ e $U_{8.50/\text{br}}$). Contrariamente ao que ocorreu com os extratos aquosos, neste caso obtiveram-se resultados idênticos incluindo ou excluindo o tumor P da comparação entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI, sugerindo que a heterogeneidade deste tumor não afetava a sua composição lipídica.

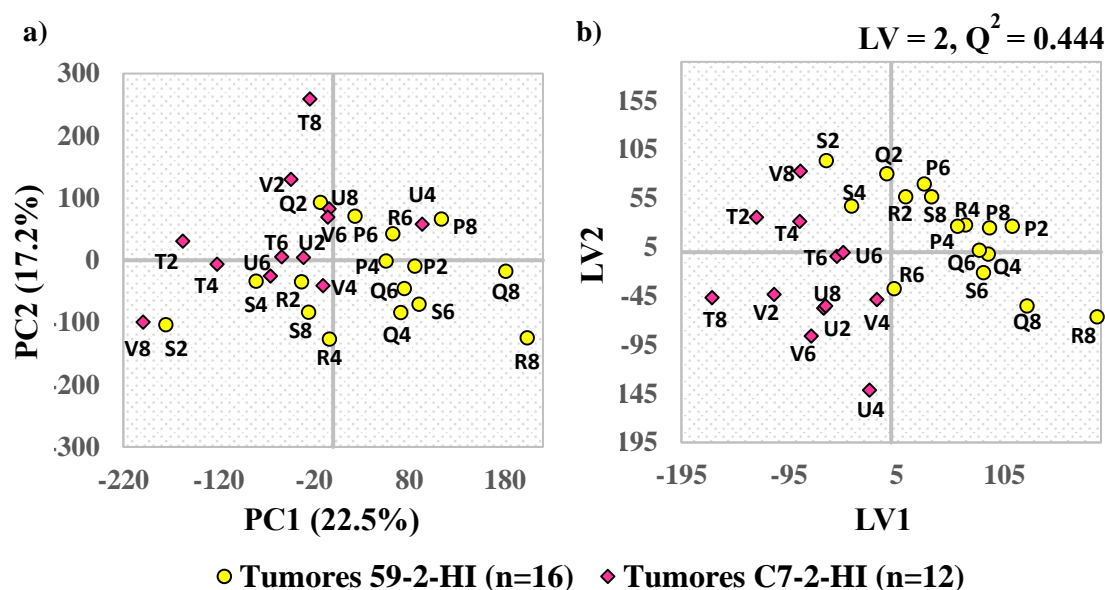


Figura 27 – Diagrama de *scores* de PCA (a) e PLS-DA (b) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos lipídicos dos tumores mamários P, Q, R e S do tipo 59-2-HI (●) e T, U e V do tipo C7-2-HI (◆). Estes modelos estatísticos não incluíram as regiões espectrais dos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), do metanol (3.57-3.36 ppm) e do TMS (0.15-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q²**, coeficiente de relevância preditiva.

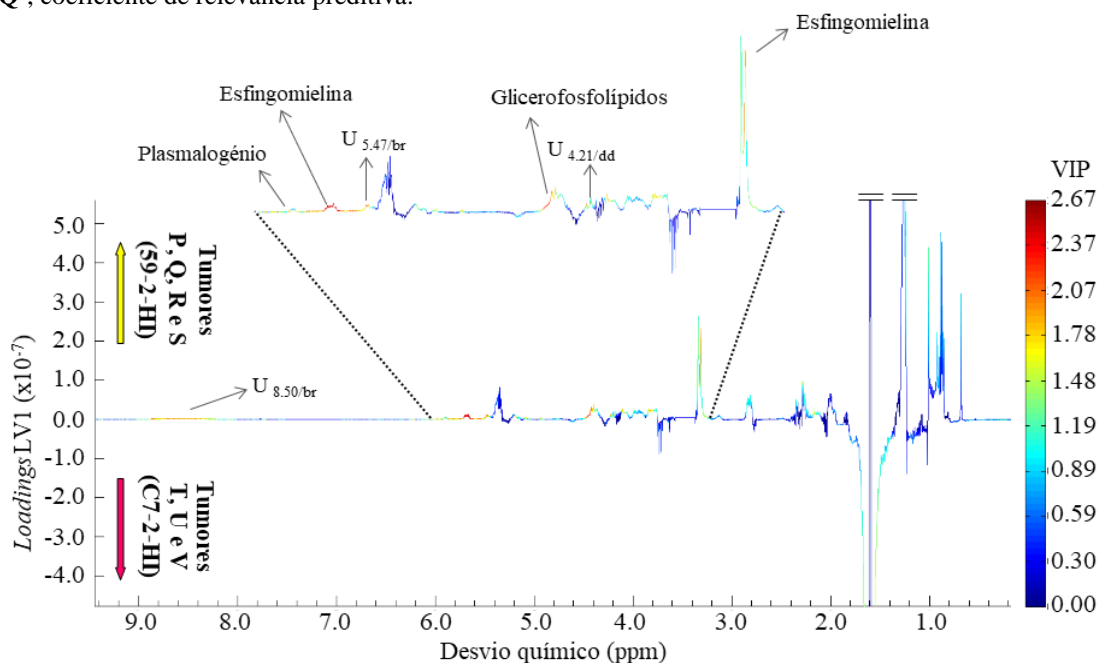


Figura 28 – Diagrama de *loadings* de LV1 do modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos lipídicos dos tumores mamários P, Q, R e S (tipo 59-2-HI) com os T, U e V (tipo C7-2-HI). A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja). Os metabolitos aumentados nos tumores do tipo 59-2-HI identificaram-se na região positiva do eixo *Loadings* LV1, não se identificando nenhum composto aumentado nos tumores C7-2-HI (região negativa do eixo *Loadings* LV1).

Como pode observar-se na Tabela 9, a esfingomielina e alguns metabolitos desconhecidos ($\text{U}_{4.21/\text{dd}}$ e $\text{U}_{8.50/\text{br}}$) tiveram níveis estatisticamente aumentados nos tumores 59-2-HI,

comparativamente aos tumores C7-2-HI.

Tabela 9 - Metabolitos lipofílicos estatisticamente diferentes entre os tumores P, Q, R e S do tipo 59-2-HI (n=16 octantes) e os tumores T, U e V do tipo C7-2-HI (n=12 octantes). **a,b**) Informação detalhada na Tabela 7. **c**) Todos os valores de *p-value* permaneceram estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um *cutoff* de $\frac{0.05}{3} = 1.67 \times 10^{-2}$.

$\delta \text{ } ^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	<i>p-value</i> ^{b,c}
5.68 (m)	Esfingomielina	2.59 ± 1.01	2.00×10^{-5}
4.21 (dd)	U _{4.21/dd}	1.23 ± 0.82	4.63×10^{-3}
8.50 (br)	U _{8.50/br}	1.51 ± 0.85	8.30×10^{-4}

No *heatmap* da Figura 29a,b apresentam-se as integrações normalizadas dos metabolitos listados na Tabela 9, sendo clara a grande variabilidade entre tumores do mesmo tipo e a nível intra-tumoral. Ainda assim, a discriminação entre as cores dos tumores 59-2-HI e C7-2-HI foi perceptível, especialmente em termos de esfingomielina e U_{8.50/br}.

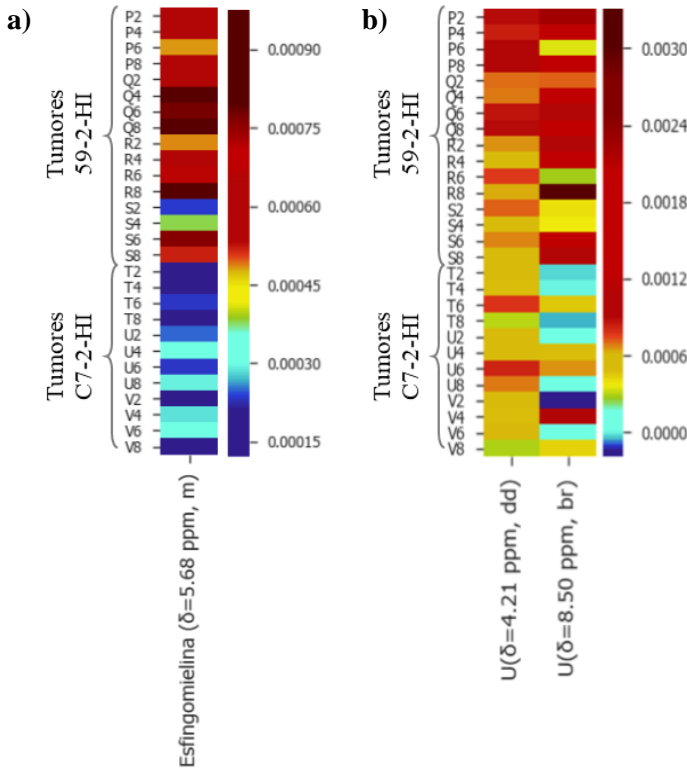


Figura 29 - *Heatmap* representativo das quantidades relativas dos principais metabolitos lipofílicos conhecidos **(a)** e desconhecidos **(b)** que diferem entre os tumores do tipo 59-2-HI (P, Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V). Nas linhas e colunas apresentam-se, respetivamente, os octantes tumorais analisados por RMN de ^1H e os metabolitos selecionados. Ambas as escalas de cores foram atribuídas da integração normalizada máxima (vermelho escuro) à mínima (azul escuro). **br**, sinal largo (de “*broad*”); **dd**, duplo duplete; **m**, multiplete.

Na Figura 30 destacam-se os sinais integrados para o cálculo do grau médio de insaturação (segundo a Equação 6), grau médio de poliinsaturação (segundo a Equação 7) e comprimento médio da

The ^1H NMR spectrum of polybutadiene shows several characteristic peaks. The assignments are as follows:

- $\text{HC}=\text{CH}-$: Vinyl protons, appearing as a multiplet around 5.5 ppm.
- $=\text{CH}-\text{CH}_2-$: Vinyl protons, appearing as a multiplet around 2.1 ppm.
- $-\text{CH}_2-\text{CO}-$: Allylic protons, appearing as a multiplet around 2.3 ppm.
- $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$: Allylic protons, appearing as a multiplet around 2.0 ppm.
- $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$: Protons in the $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ group adjacent to the carbonyl group, appearing as a multiplet around 1.7 ppm.
- $-\text{CH}_2-$: Methylene protons in the main chain, appearing as a multiplet around 1.4 ppm.
- $-\text{CH}_3$: Methyl protons, appearing as a multiplet around 1.0 ppm.

a)

Grau médio de insaturação

Condição	Grau médio de insaturação
S9-2-HII	~0.54
C7-2-HII	~0.55

b)

Grau médio de polinsaturação

Condição	Grau médio de polinsaturação
S9-2-HII	~0.26
C7-2-HII	~0.27

c)

Comprimento médio da cadeia dos FAs

Condição	Comprimento médio da cadeia dos FAs
S9-2-HII	~13.0
C7-2-HII	~13.5

3.2.1.3. Interpretação bioquímica

Neste subcapítulo interpretam-se as variações metabólicas observadas entre os tumores mamários 59-2-HI e C7-2-HI. Como a análise dos extratos aquosos já demonstrou que o tumor P apresentava um perfil metabólico possivelmente distinto dos restantes tumores do tipo 59-2-HI, a interpretação realizada nesta secção apenas comparou os tumores Q, R e S (tipo 59-2-HI) com os tumores T, U e V (tipo C7-2-HI). Na discussão que se segue começa por se analisar as alterações metabólicas entre os dois tipos de tumores observadas em cada família de metabolitos, considerando-se posteriormente a relação metabólica entre as células tumorais e os restantes elementos do micro-ambiente tumoral. De forma a facilitar a interpretação dos resultados, as principais diferenças metabólicas entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI estão esquematizadas na Figura 32.

Metabolitos do metabolismo energético

Relativamente aos intermediários da glicólise, verificou-se que os dois tipos de tumores em estudo diferiram significativamente em termos de níveis de piruvato, estando estes aumentados no tipo 59-2-HI comparativamente ao tipo C7-2-HI, o que poderá refletir: **a)** uma taxa glicolítica superior que, apesar de ser geralmente relacionada com tumores mais proliferativos/agressivos, não reflete necessariamente o grau de proliferação tumoral [174]; **b)** o maior catabolismo de alanina, cujo nível se encontrou realmente diminuído nos tumores 59-2-HI em relação aos tumores C7-2-HI; e/ou **c)** a menor conversão de piruvato noutros metabolitos (como lactato, certos aminoácidos e/ou acetil-CoA). Estes aspetos podem ser influenciados por alguns fatores específicos, como o grau de vascularização (explorado em detalhe mais à frente) e a expressão/atividade diferencial de enzimas ou transportadores chave. Neste contexto, explorou-se bastante o papel das isoformas A e B da LDH [210,211] que catalisam, respetivamente, a conversão de piruvato a lactato e de lactato a piruvato. Nesta tese, apesar dos níveis aumentados de piruvato nos tumores 59-2-HI, ambos os tipos de tumores possuíam níveis comparáveis de lactato. Tal poderá significar que, comparativamente aos tumores C7-2-HI, os tumores 59-2-HI exibiram menor expressão/atividade da LDH-A (sobre-expressa em vários tipos de cancro, incluindo o BCa, onde o seu nível se relacionou com o tamanho do tumor [210]) ou maior expressão/atividade de LDH-B (mais expressa em alguns tumores mamários, especialmente *basal-like*, sendo essencial para a sua progressão [211]). Considerando que os tipos de tumores analisados nesta tese são ambos ductais (classificação histológica), ER⁺/PR⁺ (classificação IHC, [126]) e *luminal-like* (classificação molecular por aproximação IHC), a aparente diferença observada na atividade glicolítica entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI poderá significar que estes: **a)** pertenciam a diferentes classes do mesmo subtipo, uma vez que outros estudos relataram a existência de classes distintas com diferentes taxas glicolíticas dentro do mesmo subtipo [167]; e/ou **b)** possuíam diferentes taxas de proliferação ou graus de vascularização.

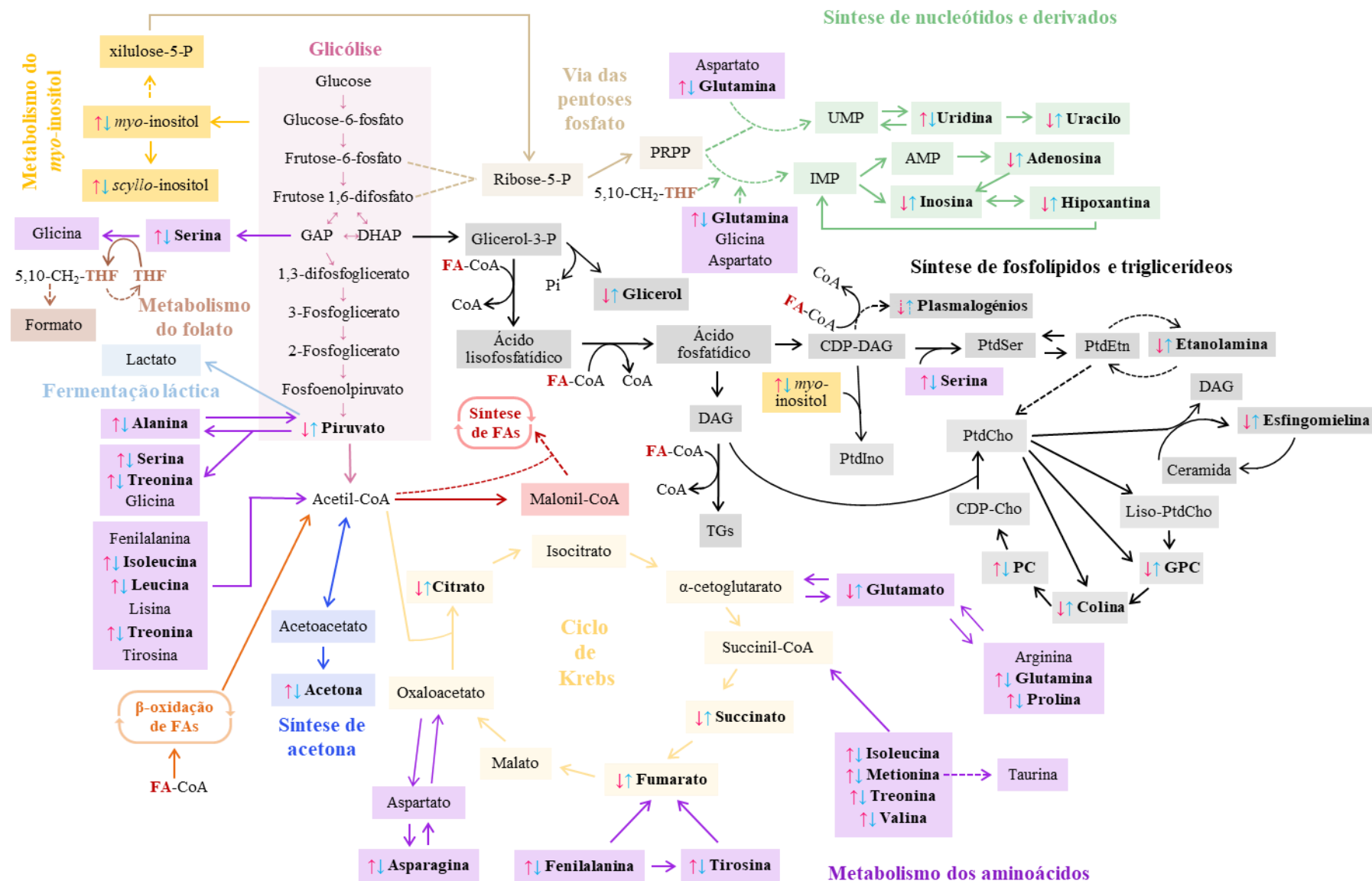


Figura 32 - Representação esquemática das principais diferenças metabólicas (destacadas a negrito) entre os tumores mamários 59-2-HI (Q, R e S, setas azuis) e C7-2-HI (T, U e V, setas rosa). **AMP**, adenosina monofosfato; **CDP**, citidina difosfato; **CoA**, coenzima A; **DAG**, diacilglicerol; **DHAP**, diidroxiacetona fosfato; **FA**, ácido gordo; **GAP**, gliceraldeído 3-fosfato; **GPC**, glicerofosfocolina; **IMP**, inosina monofosfato; **PC**, fosfocolina; **PRPP**, fosforribosil pirofosfato; **PtdCho**, fosfatidilcolina; **PtdEtn**, fosfatidiletanolamina; **PtdIno**, fosfatidilinositol; **PtdSer**, fosfatidilserina; **TGs**, triglicerídeos; **THF**, tetra-hidrofolato; **UMP**, uridina monofosfato.

O facto de alguns intermediários do ciclo de *Krebs* (citrato, succinato e fumarato) terem estado aumentados nos tumores 59-2-HI em relação aos tumores C7-2-HI poderá significar: **a)** a maior atividade deste ciclo (alimentado pelo piruvato glicolítico e /ou pela glutamina); ou **b)** a menor utilização destes metabolitos; ou ainda **c)** o comprometimento da atividade de algumas enzimas chave do ciclo de *Krebs*. O citrato é importante na regulação da energia celular, exercendo um *feedback* negativo em várias enzimas glicolíticas e do ciclo de *Krebs* [212]. Ao abandonar a mitocôndria (local da sua produção), é convertido em Acetil-CoA (que permite a síntese lipídica) e oxaloacetato (que pode ser convertido em piruvato). Conforme se pode verificar na Figura 33a o nível superior de citrato nos tumores Q, R e S (em relação aos tumores T, U e V) poderá promover outras alterações metabólicas observadas neste tipo, como o aumento do teor de outros intermediários deste ciclo, de piruvato e de alguns lípidos (principalmente esfingomiélin). A acumulação de succinato nos tumores 59-2-HI poderá relacionar-se com a diminuição da expressão/atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH), que catalisa a oxidação de succinato a fumarato. Apesar de diversos cancros terem apresentado mutações que levam à perda de função desta enzima, Kim *et al.* [213] demonstraram que tal parece ser raro no BCa (~3%). Da mesma forma, níveis mais elevados de fumarato nos tumores Q, R e S poderão dever-se à perda de função da fumarato hidratase (FH), enzima que catalisa a hidratação do fumarato a malato. Vários trabalhos em cancro renal [214,215] revelaram que mutações que levavam à perda de função de FH contribuíam para outras alterações metabólicas também observadas na presente tese (Figura 33b). Noutros estudos, a acumulação de intermediários do ciclo de *Krebs* associados à maior atividade deste ciclo foi relacionada com a maior capacidade metastática dos tumores mamários [216]. Contudo, analisando linhas celulares altamente metastáticas (4T1) e não metastáticas (67NR) derivadas de murganhos BALB/c, Simões *et al.* [217] verificaram a elevação de certos intermediários do ciclo de *Krebs* devido à menor atividade deste ciclo (como o aumento de succinato causado por defeitos da enzima SDH) em células não metastáticas. Enquanto que as células 67NR apresentaram uma resposta hipóxica independente da presença de O₂, as células 4T1 foram mais adaptáveis às condições do microambiente tumoral. O facto dos tumores 59-2-HI não terem apresentado um aumento uniforme dos intermediários do ciclo de *Krebs*, mas sim uma acumulação de alguns intermediários possivelmente resultante da menor atividade deste ciclo, sugere que estes tumores eram menos metastáticos/agressivos que os C7-2-HI, o que veio ao encontro das informações disponibilizadas diretamente pela Dra. Lanari relativamente ao modelo animal em estudo nesta tese.

Aminoácidos

Em relação aos tumores C7-2-HI, os 59-2-HI apresentaram níveis inferiores de vários aminoácidos essenciais (Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Phe e Met) e não essenciais (Ala, Asn, Gln, Pro, Ser e Tyr). Tal poderá estar relacionado com: **a)** a maior capacidade energética dos tumores 59-2-HI e, portanto, uma maior síntese proteica neste tipo; e/ou **b)** a exposição dos tumores C7-2-HI a situações de *stress* que

resultam na diminuição da síntese proteica e/ou no aumento da degradação proteica (*e.g.* através da autofagia), com o consequente aumento dos níveis de aminoácidos [218]. Além de serem constituintes das proteínas, muitos aminoácidos desempenham outras funções no metabolismo cancerígeno [219]. A serina foi o metabolito com maior variação entre os tipos de BCa analisados nesta tese, sendo que os tumores C7-2-HI apresentaram um nível mais de 5x superior aos tumores 59-2-HI. Segundo Pollari *et al.* [220], o maior teor deste aminoácido nos tumores C7-2-HI poderá relacionar-se com a sua maior capacidade metastática. Apesar de não ser claro como tal se processa, comprovou-se que a fosfoglicerato desidrogenase (envolvida na síntese de serina a partir do gliceraldeído-3-P) é sobre-expressa em alguns tumores mamários (especialmente nos ER⁻) [221]. A serina pode ser convertida em glicina por ação da serina hidroximetiltransferase, cuja isoforma mitocondrial se encontra sobre-expressa no BCa, especialmente nos estádios mais avançados da doença [222]. Além disso, o aumento do teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs - Leu, Ile e Val) é uma característica do BCa, sendo geralmente acompanhado pelo aumento da expressão da BCAA transaminase 1, que permite o catabolismo dos BCAAs [223]. Na presente tese, os níveis superiores de BCAAs no tipo C7-2-HI (em relação ao 59-2-HI) poderão indicar uma expressão superior da BCAA transaminase 1 e, consequentemente, maior ativação da via mTOR, que promove a proliferação tumoral ao induzir a biogénese mitocondrial e a atividade do ciclo de *Krebs*. Por sua vez, a glutamina é um precursor anaplerótico do ciclo de *Krebs* e essencial para a síntese de nucleótidos. Este aminoácido influencia de forma diferencial elementos distintos do micro-ambiente tumoral [224]. Enquanto que nas células MCF-7 a glutamina inibiu a glicólise e a apoptose, nos fibroblastos associados ao cancro (CAFs) induziu a perda de expressão de caveolina 1 (Cav-1) com o consequente aumento da autofagia celular.

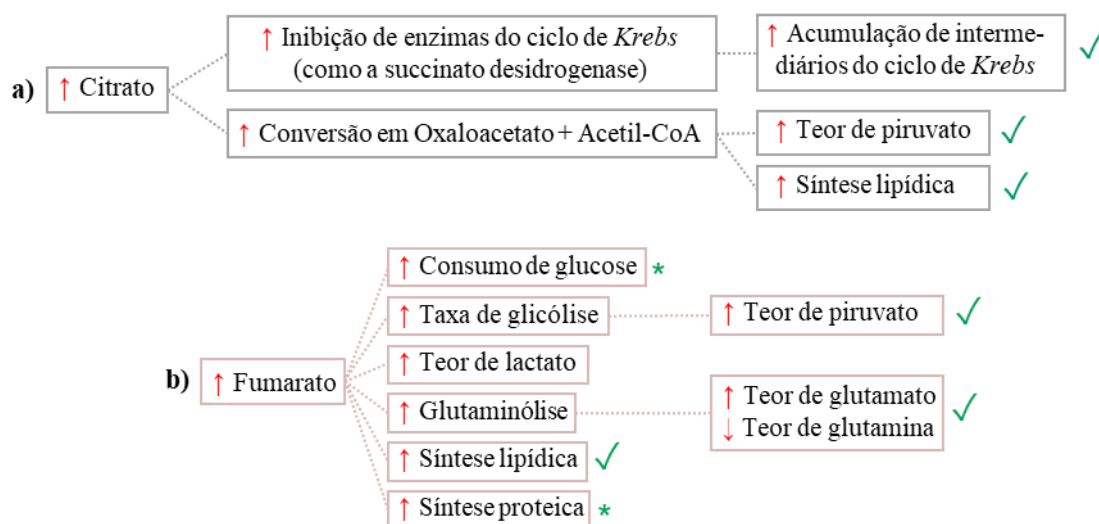


Figura 33 – Representação esquemática dos efeitos metabólicos descritos na literatura resultantes do aumento dos níveis de (a) citrato [212] e (b) fumarato [214,215]. Os símbolos “✓” representam alterações metabólicas observadas nos tumores Q, R e S, onde os níveis de citrato e fumarato estiveram mais elevados que nos tumores T, U e V. O asterisco (*) destaca alterações não observadas diretamente na presente tese, cuja confirmação necessitará de testes adicionais. O aumento e diminuição representaram-se com setas vermelhas (↑ ou ↓).

Nucleótidos e derivados

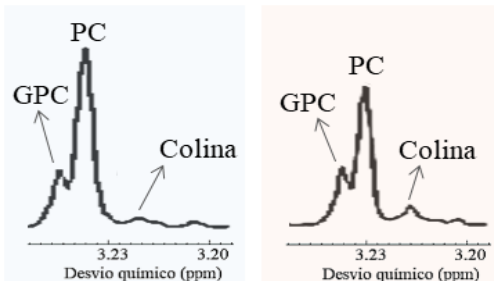
Tal como já foi referido, verificou-se a ausência total de nucleótidos nos espectros de ambos os tipos de tumores analisados, sendo que os tumores 59-2-HI foram os que apresentaram níveis mais elevados de vários produtos de degradação destes compostos (como uracilo, hipoxantina e adenosina/inosina). Sabe-se que a sobre-expressão da ecto-5'-nucleotidase (enzima que catalisa a hidrólise de AMP extracelular em adenosina) promove elevados níveis de adenosina no microambiente tumoral de vários cânceros [225]. Dependendo do tipo de tecido e do tipo de recetores que ativa, a adenosina pode induzir ou inibir a proliferação tumoral [226]. Especificamente no BCa, verificou-se que subtipos distintos estão associados a diferentes níveis de expressão dos recetores de adenosina e que a ativação do mesmo tipo de recetor pode ter efeitos diferentes no comportamento celular [227,228]. Relativamente ao tipo C7-2-HI, os tumores 59-2-HI caracterizaram-se por níveis inferiores de uridina e superiores de uracilo, o que poderá dever-se a uma maior expressão/atividade da uridina fosforilase (UPase) [229]. Verificou-se maior atividade desta enzima em tecido tumoral mamário comparativamente a tecido normal, tendo-se sugerido que mutações no gene *p53* poderão ter um papel importante na indução da atividade desta enzima. Além disso, demonstrou-se que a maior expressão da UPase no BCa se relacionava com menores taxas de sobrevivência e maior relapso dos pacientes, sugerindo-se como marcador de prognóstico [230].

Colina e derivados

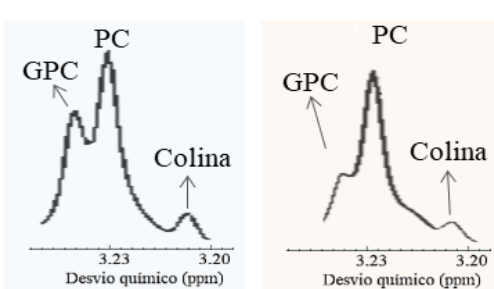
Relativamente aos compostos de colina (rever Figura 23), na presente tese verificou-se que: **a)** os tumores C7-2-HI apresentaram um teor de Colina > PC > GPC; **b)** nos tumores 59-2-HI, ainda que tenha existido maior variabilidade nos níveis destes metabolitos, observou-se uma clara tendência para um nível de Colina > GPC > PC. Segundo Cao *et al.* [164], os compostos de colina mais abundantes nas células normais e tumorais mamárias eram, respetivamente, GPC e PC. Os mesmos autores verificaram que apesar das células tumorais mamárias ER⁻ (MBA-MB-231) terem apresentado uma razão PC/GPC mais elevada que as células ER⁺ (MCF-7), ambas exibiam um nível de PC > GPC > Colina (Figura 34a). Comparando tumores mamários de modelos animais (*luminal-like* e *basal-like*) e de humanos (ER⁺ e ER⁻) existiu maior concordância (Figura 34b,c), verificando-se que os tumores ER⁻/PR⁻/HER2⁻ e *basal-like* (geralmente associados a um pior prognóstico) apresentaram um nível de GPC mais elevado que os tumores ER⁺/PR⁺ e *luminal-like* [173,197]. Ainda que ambos os tipos de tumores da presente tese sejam *luminal-like*, os tumores 59-2-HI assemelharam-se mais ao subtipo *basal-like* do estudo anteriormente mencionado. Neste contexto importa referir que as condições do microambiente tumoral (como a hipóxia) poderão ser responsáveis pela elevação dos níveis de PC nos tumores C7-2-HI [231]. Na Figura 34a,b,c também se notou que o BCa geralmente se associa a níveis baixos de colina (comparativamente a PC e GPC), contrariamente ao que ocorreu nos tumores 59-2-HI e C7-2-HI. Tal poderá estar

relacionado com o eventual atraso no congelamento das amostras após a sua recolha [201] ou com o seu prolongado tempo de armazenamento a -80°C [232].

a) Linhas celulares



b) Modelos animais



c) Pacientes humanos

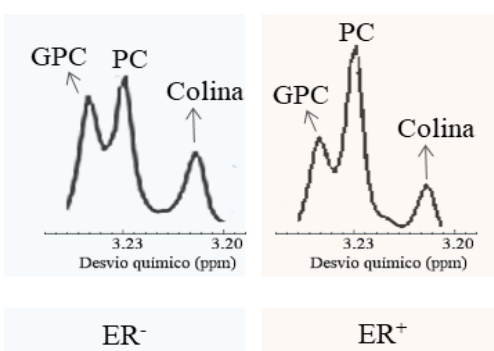


Figura 34 – Sinais de espectros RMN de ^1H característicos dos compostos de colina em: **a)** extratos polares de linhas celulares ER^- (MDA-MB-231) e ER^+ (MCF-7) obtidos pelo método de metanol-clorofórmio-água (adaptado da referência [164]). **b)** tumores mamários *basal-like* (ER^-) e *luminal-like* (ER^+) de modelos PDX obtidos por RMN com HRMAS (adaptado da referência [197]). **c)** tumores mamários $\text{ER}^-/\text{PR}^-/\text{HER2}^-$ e ER^+/PR^+ de pacientes obtidos por RMN com HRMAS. **PC**, fosfocolina; **GPC**, glicerofosfocolina.

Lípidos

Comparativamente com os tumores C7-2-HI, a maior riqueza em alguns fosfolípidos (principalmente esfingomielina) observada nos tumores 59-2-HI poderá refletir a sua maior proliferação celular. Estas diferenças metabólicas entre os dois tipos de tumores poderão também relacionar-se com: **a)** diferentes níveis de precursores dos fosfolípidos, sendo que os tumores 59-2-HI apresentaram de facto maior teor em colina, etanolamina e glicerol; e/ou **b)** atividade/expressão diferencial das enzimas envolvidas na síntese/degradação de fosfolípidos. Além do seu papel como constituintes estruturais da membrana celular, os fosfolípidos têm grande influência no metabolismo tumoral, fazendo com que o maior

grau de proliferação/agressividade tumoral não se traduza necessariamente no aumento do nível de todas as classes individuais de fosfolípidos. Por exemplo, o maior grau de agressividade/proliferação do BCa foi relacionado com níveis inferiores de PtdCho e superiores de fosfolípidos com ligações éter (como os plasmalogénios) [233,234]. Neste contexto, os plasmalogénios poderão aumentar a estabilidade de *rafts* lipídicos, que consistem em microdomínios da membrana celular extremamente dinâmicos e ricos em certos lípidos (como colesterol e esfingolípidos) e proteínas (como Cav-1) e com grande influência na transdução de sinais [235]. Analisando células de BCa ER-/PR-/HER2-, constatou-se que a integridade dos *rafts* lipídicos era importante para a sobrevivência, invasão e angiogénese tumorais [236]. Tendo em conta a influência do teor plasmalogénico nos processos de fusão membranar [237], esperava-se que os tumores 59-2-HI tivessem tendência para libertar mais vesículas plasmáticas para o meio extracelular. Segundo Kim *et al.* [238], a elevação dos níveis de esfingomiélinina nestas vesículas podia contribuir para o aumento da capacidade angiogénica tumoral. Assim, o facto dos níveis mais elevados de esfingomiélinina no tipo 59-2-HI serem acompanhados por uma tendência para um teor superior de plasmalogénio poderá sugerir que estes tumores apresentavam maior grau de vascularização que os tumores C7-2-HI, que provavelmente experienciavam um ambiente mais hipóxico. Os níveis inferiores de esfingomiélinina observados nos tumores C7-2-HI podiam também dever-se ao aumento da hidrólise deste fosfolípido por ação da esfingomiélinase, originando ceramida, composto cujo aumento foi associado em tumores mamários menos proliferativos [239].

Outros metabolitos

Quanto à creatina e fosfocreatina, sabe-se que os seus níveis estão relacionados com a produção de energia nas células tumorais [240]. A enzima creatina cinase está envolvida neste processo, catalisando a fosforilação reversível de creatina em fosfocreatina. Estudos recentes comprovaram que células do cancro colorretal metastizadas no fígado (principal órgão de síntese de creatina) eram capazes de secretar creatina cinase, levando ao aumento dos níveis de fosfocreatina no meio extracelular. Este composto era posteriormente incorporado pelas células tumorais, onde servia de fonte de fosfato na síntese de ATP, libertando-se creatina [240]. Verificou-se que diversos tumores mamários primários também sobre-expressavam a isoforma BB da creatina cinase, aumentando a agressividade tumoral com a elevação da expressão desta enzima [241]. Caso os tumores mamários analisados na presente tese também secretassem creatina cinase para o meio extracelular, o aumento dos níveis de creatina no tipo 59-2-HI poderá associar-se à maior produção de ATP relativamente a C7-2-HI.

Alguns estudos metabólicos realizados em BCa verificaram que os níveis de *myo-* e/ou *scyllo*-inositois se relacionavam com diversos fatores de prognóstico (como o estágio histológico e a expressão de recetores hormonais) [158,242]. Contudo, ainda não é claro o papel desempenhado por estes poliálcoois num contexto tumoral. No interior das células, o *myo*-inositol pode ser incorporado em

vários compostos (como os fosfolípidos e fosfatos), alguns dos quais estão envolvidos na transdução de sinais [243]. Este metabolito também funciona como osmorregulador orgânico, acumulando-se no meio intracelular quando as células são expostas a condições hipertônicas [244].

A acetona é um corpo cetónico produzido a partir de acetil-CoA através da cetogénese. Analisando o perfil metabólico de vários tipos de células de BCa por RMN com HRMAS, Maria *et al.* [245] sugeriram que níveis superiores de acetona poderão refletir o elevado nível de cetogénese associado a células tumorais com maior capacidade invasiva e pior prognóstico. No mesmo estudo, a ausência de outros corpos cetónicos (como o acetoacetato) foi interpretada como indicativo da sua elevada conversão em acetil-CoA (processo de cetólise), ativando o ciclo de *Krebs* e a fosforilação oxidativa. Ao promover a sobre-expressão de enzimas envolvidas na cetólise e cetogénese em células de BCa e CAFs (respetivamente), confirmou-se a influência do metabolismo de corpos cetónicos na proliferação tumoral e capacidade metastática [246]. O papel exercido pelos CAFs neste contexto será explorado na secção seguinte. O facto de os tumores C7-2-HI terem apresentado níveis superiores de acetona comparativamente com os 59-2-HI esteve de acordo com a sua maior capacidade metastática.

Relação dos elementos do microambiente tumoral com o perfil metabólico

Vários estudos evidenciaram que as células cancerígenas (epiteliais) e o estroma tumoral (que inclui células do sistema imune, fibroblastos, vasos sanguíneos e matriz extracelular) se influenciavam mutuamente a diversos níveis [133]. Nesta secção pretende-se explorar o modo como cada elemento do microambiente tumoral poderá promover ou ser influenciado pelos perfis metabólicos observados nos tumores 59-2-HI e C7-2-HI.

As células cancerígenas libertam vários fatores angiogénicos que promovem o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para suportar os seus requisitos de O₂ e nutrientes, no entanto, além deste processo não acompanhar a rápida proliferação, a vasculatura tumoral apresenta anomalias frequentes [247]. Assim, surgem regiões de hipóxia e/ou de privação nutritiva que têm grande impacto no metabolismo tumoral. Medindo a densidade de micro-vasos sanguíneos intra-tumorais através de IHC, Dhakal *et al.* [248] demonstraram que tumores mamários com maior irrigação correspondiam frequentemente a estádios histológicos mais avançados, à ausência de ER e PR, à maior infiltração por células imunes, ao maior relapso e menor sobrevivência. Apesar de não se conseguir inferir o grau de vascularização dos tumores analisados na presente tese considerando apenas os resultados obtidos, reconhece-se a importância deste parâmetro. Na verdade, a existência de diferentes graus de vascularização nos tumores 59-2-HI e C7-2-HI têm grande impacto na interpretação bioquímica. Exemplificando para o caso do nível de piruvato tem-se que: **a)** com igual nível de vascularização, o teor idêntico de glucose nos dois tipos de tumores poderá sugerir que o aumento de piruvato não se devia ao maior consumo de glucose ou à maior taxa glicolítica; **b)** caso os tumores 59-2-HI fossem mais vascularizados que os tumores C7-2-HI, para apresentarem um nível de glucose equivalente tinham que consumir mais este metabolito, o que

podia explicar o aumento do piruvato, sendo possível que o lactato produzido fosse mais facilmente difundido para a circulação sanguínea; c) a menor vascularização dos tumores 59-2-HI também podia justificar o excesso de piruvato que se observa nestes tumores, caso ocorresse um mecanismo compensatório como o descrito por Grinde *et al.* [174], aumentando a eficácia glicolítica.

A resposta adaptativa das células tumorais à hipóxia é maioritariamente regulada pela subunidade α citoplasmática do fator induzível por hipóxia (HIF α), que induz a reprogramação do metabolismo celular como mostra a Figura 35 [218,231,249]. A estabilização ou degradação de HIF α promovem, respetivamente, um comportamento mais catabólico (elevada atividade glicolítica – efeito de *Warburg*) ou anabólico (elevada atividade do ciclo de *Krebs*) por parte das células cancerígenas. Além disso, o succinato e o fumarato também podem estabilizar HIF α independentemente da disponibilidade de O₂, possibilitando que ocorra uma resposta “hipóxica” em condições normóxicas (efeito de pseudo-hipóxia) [250]. A elevação destes metabolitos nos tumores 59-2-HI (que já se suspeitava serem mais vascularizados que os C7-2-HI) e consequente estabilização de HIF α levavam a que estes tumores tivessem preferência pela glicólise (aumentando os níveis de piruvato por haver mais glucose disponível) e fermentação láctica comparativamente à oxidação fosforilativa. Os tumores C7-2-HI, que se pensa apresentarem mais regiões hipóxicas que os 59-2-HI, possuíam realmente níveis superiores de PC e de diversos aminoácidos possivelmente devido à estabilização de HIF α .

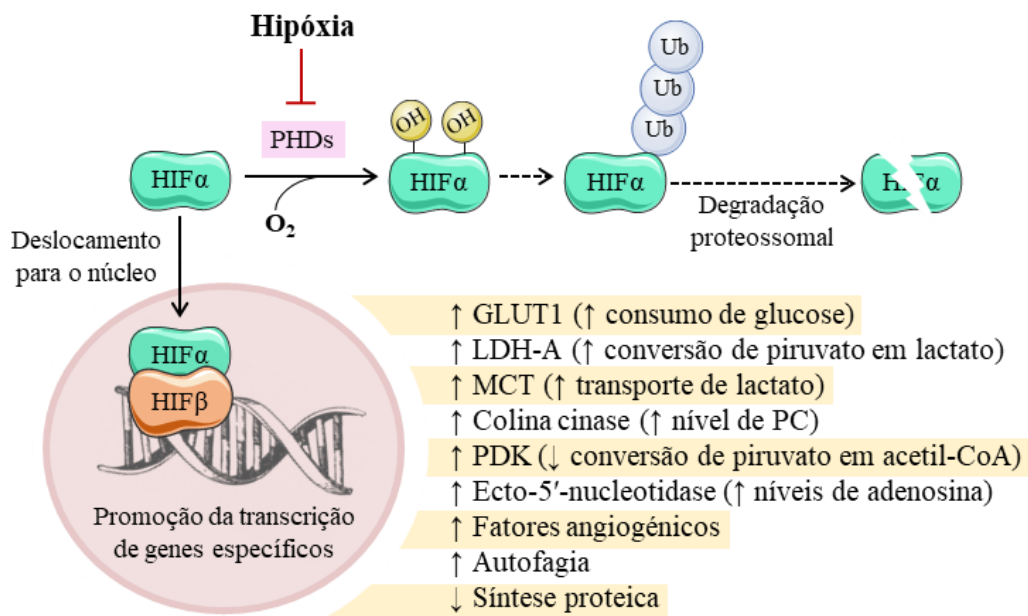


Figura 35 – Representação esquemática da resposta adaptativa das células tumorais à hipóxia. Em condições normóxicas, o HIF α é hidroxilado pelas as proxil hidroxilases (dependentes de O₂), promovendo a sua degradação proteossomal. Numa situação de hipóxia, o HIF α permanece estável e desloca-se para o núcleo, onde dimeriza com HIF β e promove a transcrição de genes específicos. **GLUT1**, Transportador de glucose 1; **HIF**, fator induzível por hipóxia; **LDH-A**, lactato desidrogenase; **MCT**, transportador de monocarboxilato; **PDK**, Piruvato desidrogenase cinase; **PHDs**, proxil hidroxilases; **Ub**, ubiquitina.

Apesar de ainda não existir um consenso acerca do mecanismo de origem dos CAFs [251], vários estudos consideraram que estes surgiam da ativação de fibroblastos normais residentes no tumor, não excluindo a existência de outras origens possíveis. Especificamente no BCa, verificou-se que a degradação lisossomal da Cav-1 nos fibroblastos (induzida pelas células tumorais MCF-7) foi suficiente para a sua conversão em CAFs [252]. Geralmente, esta ativação caracteriza-se pela promoção de um fenótipo catabólico nos fibroblastos (efeito de *Warburg* reverso), que passam a secretar metabolitos (como lactato, piruvato e corpos cetónicos) para “alimentar” a fosforilação oxidativa de células cancerígenas anabólicas [251]. Recorrendo a um modelo CDX (MDA-MB-231), Migneco *et al.* [253] comprovaram que o efeito de *Warburg* reverso (induzido pela perda de Cav-1) ocorria no BCa, sendo responsável pelo aumento da proliferação tumoral. Noutro estudo onde se analisaram células MDA-MB-231 e CAFs *in vitro*, relatou-se que a eventual exposição de CAFs a células tumorais catabólicas podia induzir um fenótipo mais anabólico nos CAFs, passando estes a consumir os metabolitos excretados pelas células tumorais para “alimentar” a sua fosforilação oxidativa [254]. Além dos seus efeitos no metabolismo tumoral, os CAFs também promovem a capacidade metastática, a angiogénese e a infiltração de macrófagos nos tumores [251]. Tendo em conta a influência dos CAFs no metabolismo das células tumorais (e *vice-versa*), seria interessante investigar se: **a)** os tumores 59-2-HI e C7-2-HI apresentavam diferentes abundâncias de CAFs e a contribuição deste fator para as variações metabólicas observadas; **b)** os CAFs presentes em cada tipo de tumor apresentavam comportamentos mais anabólicos ou catabólicos. Especificamente nos tumores 59-2-HI, podia ponderar-se a existência de CAFs mais anabólicos que consumiam o lactato libertado pelas células tumorais catabólicas, daí parecer que o nível deste metabolito não aumentou de forma proporcional ao piruvato.

A presença de células do sistema imunitário nos carcinomas pode ter um efeito anti- ou pró-tumoral [249]. Consoante as condições a que são expostos no tumor, os monócitos residentes no tecido mamário podem ser ativados de forma clássica ou alternativa originando, respetivamente, macrófagos M1 (anti-tumorais) ou M2 (pró-tumorais). Pensa-se que a secreção de lactato pelas células tumorais mamárias e/ou CAFs contribui para a ativação alternativa dos macrófagos associados ao tumor, promovendo diversas alterações metabólicas e a libertação de vários compostos (como citocinas e fatores de crescimento) que induzem a proliferação/migração tumoral, a angiogénese e a supressão da resposta imune anti-tumoral [255]. Além do lactato, outros metabolitos presentes no microambiente tumoral podem influenciar a resposta imune. De facto, os níveis superiores de adenosina (que promove uma resposta imune pró-tumoral) [225] e inferiores de *myo*-inositol (que promove uma resposta imune anti-tumoral) [256] presentes nos tumores 59-2-HI relativamente aos tumores C7-2-HI poderá significar que estes apresentavam maior quantidade de macrófagos M2. Tal esteve de acordo com os menores níveis de glutamina, já que os macrófagos M2 consomem este metabolito para obter energia através do ciclo de *Krebs* [257].

3.2.2. Comparação entre tumores do tipo 59-2-HI

3.2.2.1. Análise de extratos aquosos

Tendo em consideração que, na PCA inicial dos extratos aquosos (P, Q, R e S vs. T, U e V – Figura 21a), a maioria dos octantes do tumor P se distanciou claramente dos restantes tumores do tipo 59-2-HI, começou por se comparar o perfil metabólico deste tumor com os tumores Q, R e S. Esta separação tornou-se mais evidente com a realização de uma PCA (Figura 36a) com todos os tumores 59-2-HI. No diagrama de *scores* da PLS-DA (Figura 36b) verificou-se uma separação ainda mais acentuada das classes ao longo de LV1, refletindo a elevada robustez deste modelo ($Q^2 = 0.801$). Tanto na PCA, como na PLS-DA, se observou uma dispersão maior do tumor P relativamente aos tumores Q, R e S, levando a crer que o tumor P apresentava maior variabilidade intra-tumoral dos metabolitos hidrofílicos. Este aspeto será abordado no subcapítulo 3.3.

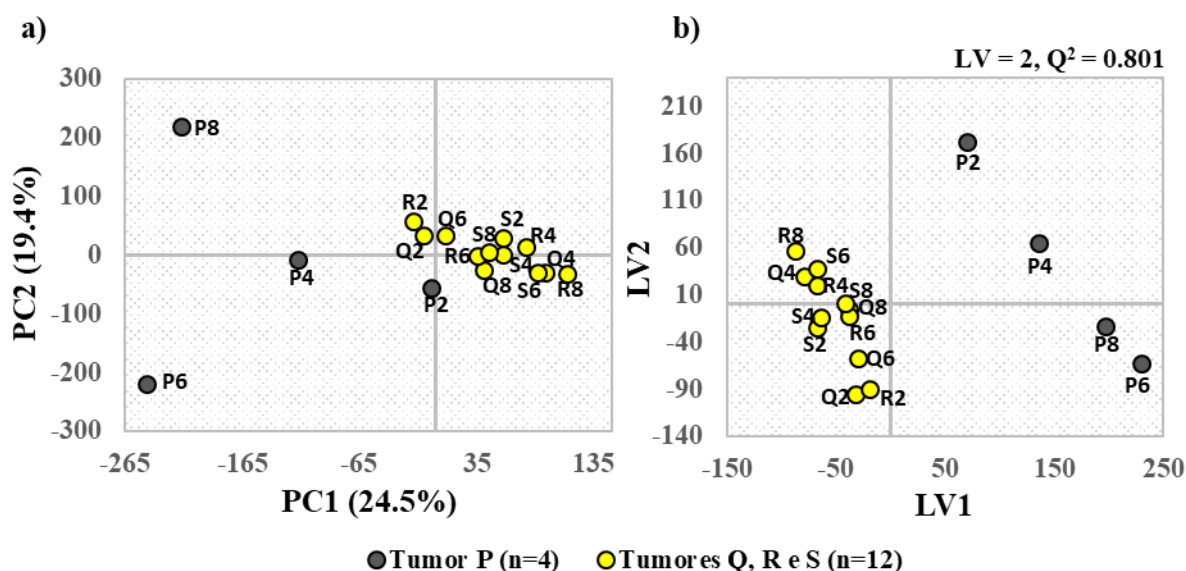


Figura 36 – Diagrama de *scores* de PCA (a) e PLS-DA (b) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos dos tumores mamários do tipo 59-2-HI: Q, R e S (●) e P (●). Estes modelos estatísticos não incluíram as regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q^2** , coeficiente de relevância preditiva.

Na Figura 37a,b apresenta-se o diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA com a identificação das principais variações metabólicas entre as classes. Algumas destas diferenças (Ile, lactato, Pro, Tyr, Val, etanolamina e $\text{U}_{3,12\text{s}}$) já eram esperadas, uma vez que a exclusão do tumor P da comparação entre os tumores 59-2-HI e C7-2-HI mascarou certas variações metabólicas (e acentuou outras). Ainda assim, certos metabolitos apenas surgiram como relevantes ao comparar o tumor P com os tumores Q, R e S (formato, fosfocreatina, Gly, His e Tau).

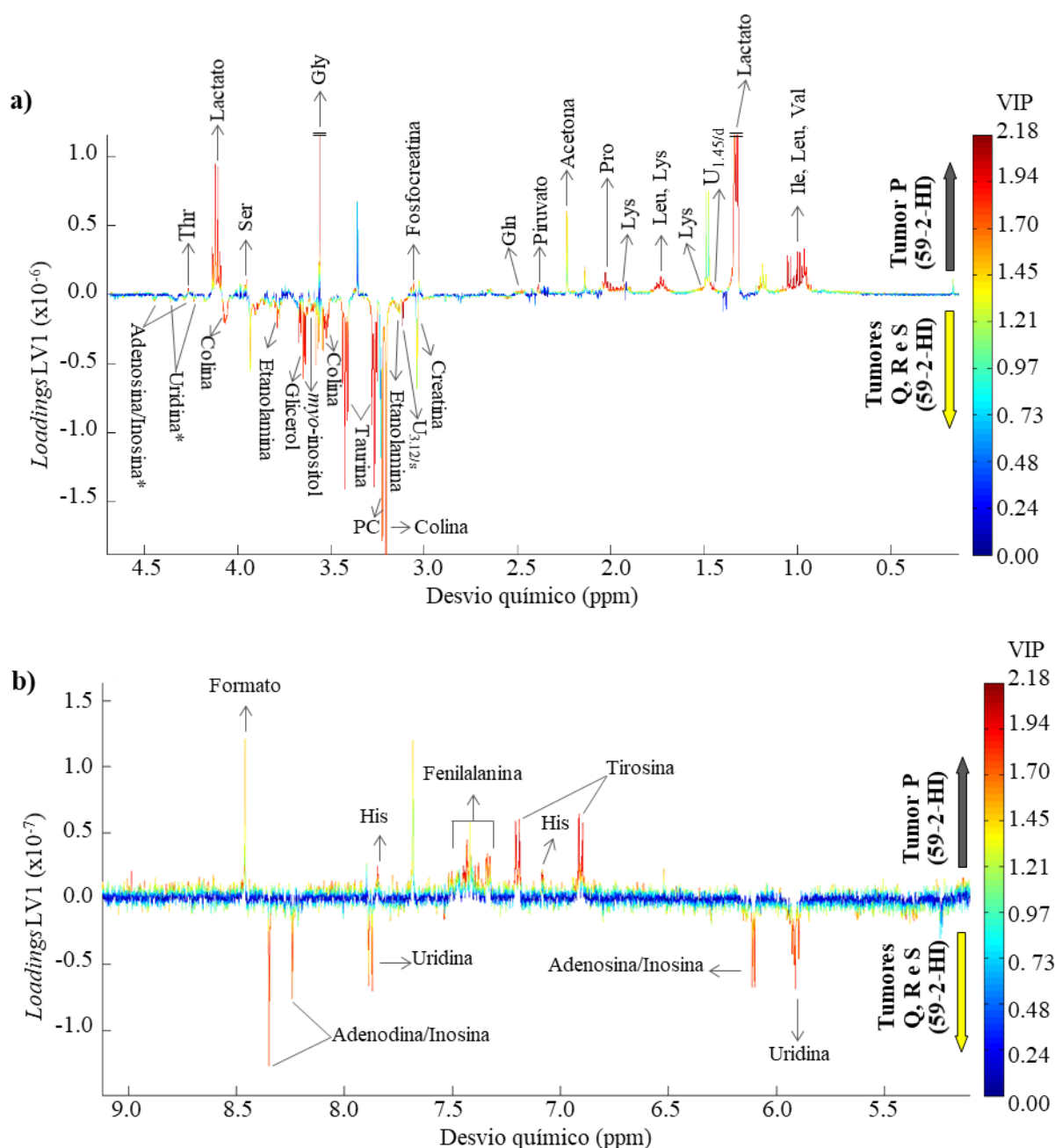


Figura 37 – Diagrama de *loadings* de LV1 do modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos aquosos dos tumores Q, R e S com o tumor P (ambos 59-2-HI), representando-se as regiões espectrais de baixo (**a**, 0.13-4.70 ppm) e alto desvio químico (**b**, 5.10-9.00 ppm). A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja), destacando-se com um asterisco (*) aqueles que se encontravam numa zona de muita sobreposição. Os metabolitos aumentados nos tumores P e Q, R e S identificaram-se, respetivamente, nas regiões positiva e negativa do eixo *Loadings* LV1. GPC, glicerofosfocolina; PC, fosfocolina.

Tal como se pode verificar na Tabela 10, em relação aos tumores Q, R e S, o tumor P caracterizou-se por níveis estatisticamente: **a)** superiores de diversos aminoácidos essenciais (Ile, Leu, Lys, Met, Phe e Val) e não essenciais (Gln, Gly, Pro e Tyr), ácidos orgânicos (formato, lactato e piruvato) e

outros metabolitos desconhecidos ($U_{1.45/d}$); **b)** inferiores de alguns compostos de colina (colina e PC), nucleósidos (adenosina/inosina), outros compostos conhecidos (etanolamina, glicerol, *myo*-inositol, Tau e uridina) e desconhecidos ($U_{3.12/s}$). Neste contexto importa referir que todas estas diferenças metabólicas deixaram de ser estatisticamente significativas após a correção de *Bonferroni*.

Tabela 10 - Metabolitos hidrofílicos estatisticamente diferentes entre os tumores P (n=4 octantes) e Q, R e S (n=12 octantes) do tipo 59-2-HI. Neste caso, os metabolitos com ES positivo e negativo encontraram-se aumentados, respetivamente, no tumor P e nos tumores Q, R e S. **a,b)** Informação detalhada na Tabela 7. **c)** Todos os valores de *p-value* deixaram de ser estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um *cutoff* de $\frac{0.05}{24} = 2.08 \times 10^{-3}$.

δ $^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	p-value ^b
0.97 (d)	Leucina	5.76 ± 2.29	3.61×10^{-3}
1.02 (d)	Isoleucina	5.87 ± 2.33	3.61×10^{-3}
1.05 (d)	Valina	6.48 ± 2.52	3.61×10^{-3}
1.92 (m)	Lisina	1.81 ± 1.29	1.09×10^{-2}
2.03 (m)	Prolina	6.84 ± 2.63	3.61×10^{-3}
2.39 (s)	Piruvato	4.07 ± 1.81	3.61×10^{-3}
2.46 (m)	Glutamina	2.38 ± 1.40	7.63×10^{-3}
2.65 (t)	Metionina	2.20 ± 1.36	5.28×10^{-3}
3.15 (t)	Etanolamina	-1.95 ± 1.32	7.63×10^{-3}
3.21 (s)	Colina	-3.62 ± 1.69	3.61×10^{-3}
3.22 (s)	Fosfocolina	-2.79 ± 1.49	3.61×10^{-3}
3.42 (t)	Taurina	-3.53 ± 1.67	3.61×10^{-3}
3.55 (dd)	Glicerol	-2.10 ± 1.35	7.63×10^{-3}
3.56 (s)	Glicina	6.83 ± 2.62	3.61×10^{-3}
3.63 (t)	<i>myo</i> -inositol	-2.45 ± 1.42	3.61×10^{-3}
3.93 (s)	Creatina	-1.83 ± 1.30	2.12×10^{-2}
4.11 (q)	Lactato	3.80 ± 1.74	3.61×10^{-3}
6.91 (d)	Tirosina	4.59 ± 1.95	3.61×10^{-3}
7.33 (m)	Fenilalanina	2.72 ± 1.47	5.28×10^{-3}
7.86 (d)	Uridina	-2.40 ± 1.40	3.61×10^{-3}
8.35 (s)	Adenosina/Inosina	-2.83 ± 1.50	5.28×10^{-3}
8.46 (s)	Formato	1.89 ± 1.31	2.12×10^{-2}
1.45 (d)	$U_{1.45/d}$	4.34 ± 1.88	3.61×10^{-3}
3.12 (s)	$U_{3.12/s}$	-7.15 ± 2.72	3.61×10^{-3}

No *heatmap* da Figura 38 apresentam-se as integrações normalizadas dos metabolitos considerados estatisticamente relevantes. Mais uma vez, estando na mesma escala, a presença de metabolitos mais abundantes (especialmente a colina e a Tau) mascarou as variações associadas a compostos menos abundantes (como a Met e o formato). Apesar disso e de uma certa variabilidade entre tumores do mesmo tipo e intra-tumoral, a maioria das diferenças metabólicas já referidas foram observadas, sendo perceptível a diferença de tons entre o tumor P e os tumores Q, R e S, principalmente em termos de alguns aminoácidos (como Gly, Leu, Pro e Tau), piruvato, lactato e $U_{3.12/s}$.

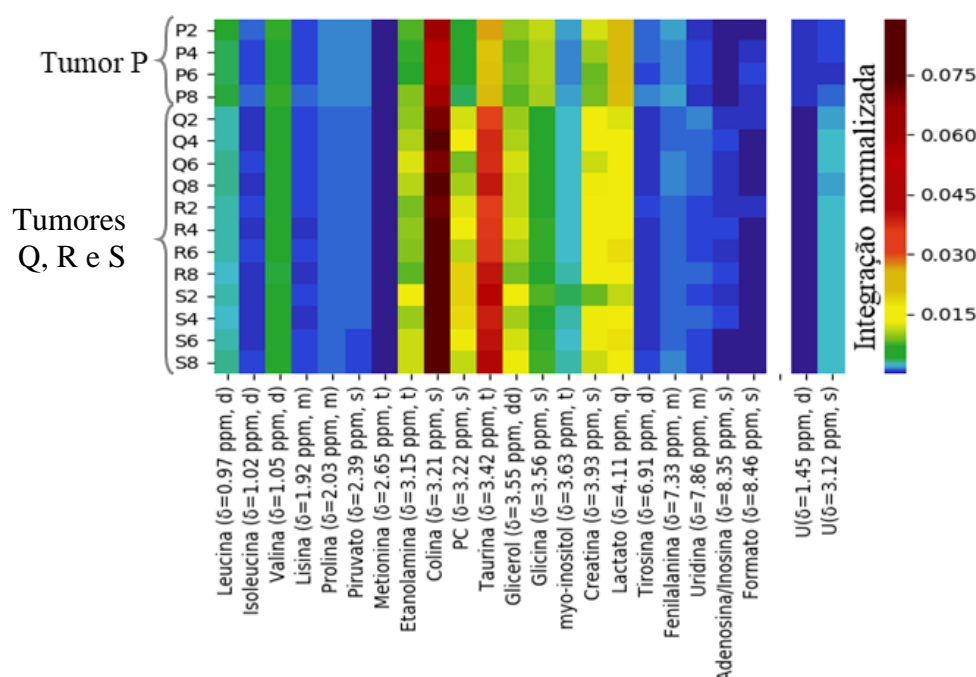


Figura 38 - *Heatmap* representativo das quantidades relativas dos principais metabolitos hidrofílicos que diferem entre os tumores do tipo 59-2-HI: Q, R e S vs. P. Nas linhas e colunas apresentam-se, respectivamente, os octantes tumorais analisados por RMN de ^1H e os metabolitos selecionados. A escala de cores foi atribuída da integração normalizada máxima (vermelho escuro) à mínima (azul escuro). **d**, duplete; **dd**, duplo duplete; **m**, multiplete; **q**, quarteto; **s**, singleto; **t**, tripleto.

Tendo em conta os modelos estatísticos já explorados (59-2-HI vs. C7-2-HI e P vs. Q, R e S), apenas o tumor P se destacou visualmente dos restantes do tipo 59-2-HI (Q, R e S). Ainda assim, realizou-se uma PCA com os tumores Q, R e S (Figura 39) para investigar eventuais variações metabólicas mais subtis, não se tendo notado qualquer discriminação entre estes tumores. Para comprovar esta observação, realizaram-se PLS-DAs comparando cada tumor com os restantes (Q vs. R e S, R vs. Q e S, S vs. Q e R), sendo que nenhum dos modelos obtidos possuiu robustez razoável ($Q^2 < 0.400$).

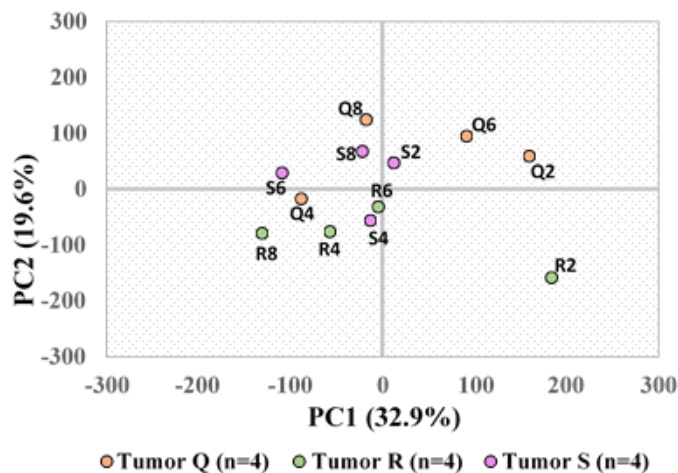


Figura 39 – Diagrama de *scores* de PCA dos espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos dos tumores mamários Q (●), R (●) e S (●) do tipo 59-2-HI. Este modelo estatístico não incluiu as regiões espectrais dos sinais da água (5.09-4.68 ppm) e do TSP (0.13-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q²**, coeficiente de relevância preditiva.

3.2.2.2. Análise de extratos lipídicos

Procedeu-se da mesma forma para os extratos lipídicos, comparando-se todos os tumores do tipo 59-2-HI numa análise de PCA (Figura 40a). O diagrama de *scores* resultante demonstrou uma clara separação do tumor P ao longo de PC2 relativamente aos restantes tumores, com a exceção do octante Q2 do tumor Q. No gráfico de *scores* da PLS-DA ($Q^2 = 0.626$, Figura 40b) observou-se uma separação ainda mais evidente do tumor P em relação aos tumores Q, R e S ao longo de LV1. Contrariamente ao que ocorreu nos extratos aquosos, a PCA e a PLS-DA dos extratos lipídicos revelaram menor dispersão do tumor P relativamente a Q, R e S, levando a crer que o P apresentava menor variabilidade intra-tumoral dos metabolitos lipofílicos. Este aspeto será explorado no subcapítulo 3.3.

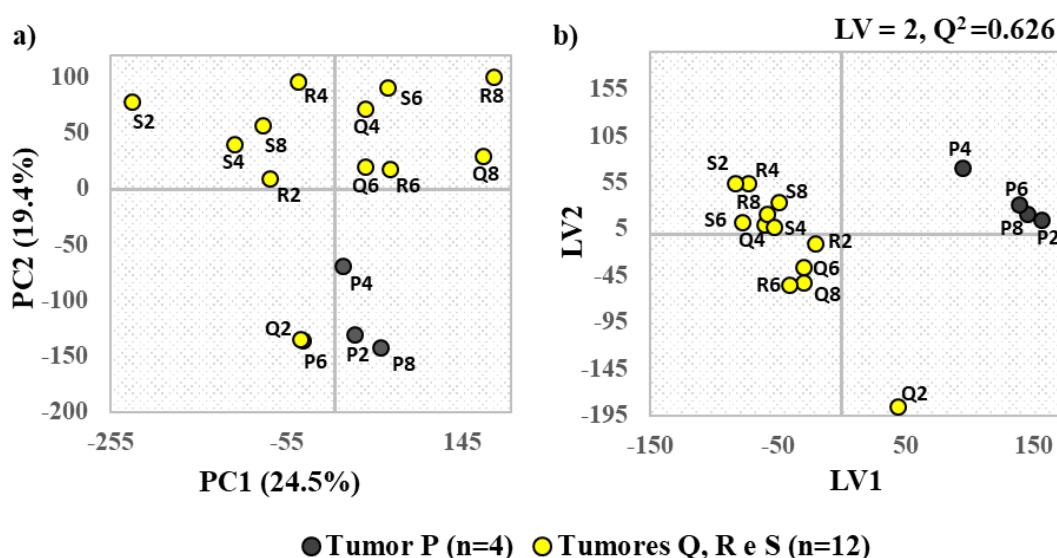


Figura 40 – Diagrama de *scores* de PCA (a) e PLS-DA (b) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos lipídicos dos tumores mamários do tipo 59-2-HI: Q, R e S (●) e P (●). Em nenhum dos modelos estatísticos se incluíram as regiões espectrais dos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), do metanol (3.57-3.36 ppm) e do TMS (0.15-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q^2** , coeficiente de relevância preditiva.

No diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA (Figura 41) destacaram-se as principais diferenças metabólicas entre os tumores Q, R e S e o tumor P.

Na Tabela 11 observa-se que, relativamente aos tumores Q, R e S, o tumor P se caracterizou por níveis estatisticamente: **a)** aumentados de $U_{0.16/s}$; **b)** diminuídos de ácido oleico, ácido linoleico e $U_{4.21/dd}$. Como nenhum sinal do espectro foi atribuído apenas ao ácido araquidónico e se observaram semelhantes ES dos sinais do ácido linoleico (2.77 ppm) e ácidos linoleico+araquidónico (2.05 ppm), não se pôde inferir se a variação deste FA apresentou de facto relevância estatística.

No *heatmap* da Figura 42a,b mostram-se as integrações normalizadas dos metabolitos considerados estatisticamente relevantes. Apesar de uma certa variabilidade intra-tumoral e entre os tumores Q, R e S, as diferenças metabólicas já referidas puderam confirmar-se. Tal como já era esperado tendo em

conta a PCA e PLS-DA realizadas (Figura 40a,b), observou-se alguma semelhança de metabolitos lipofílicos entre o tumor P e o octante Q2 do tumor Q.

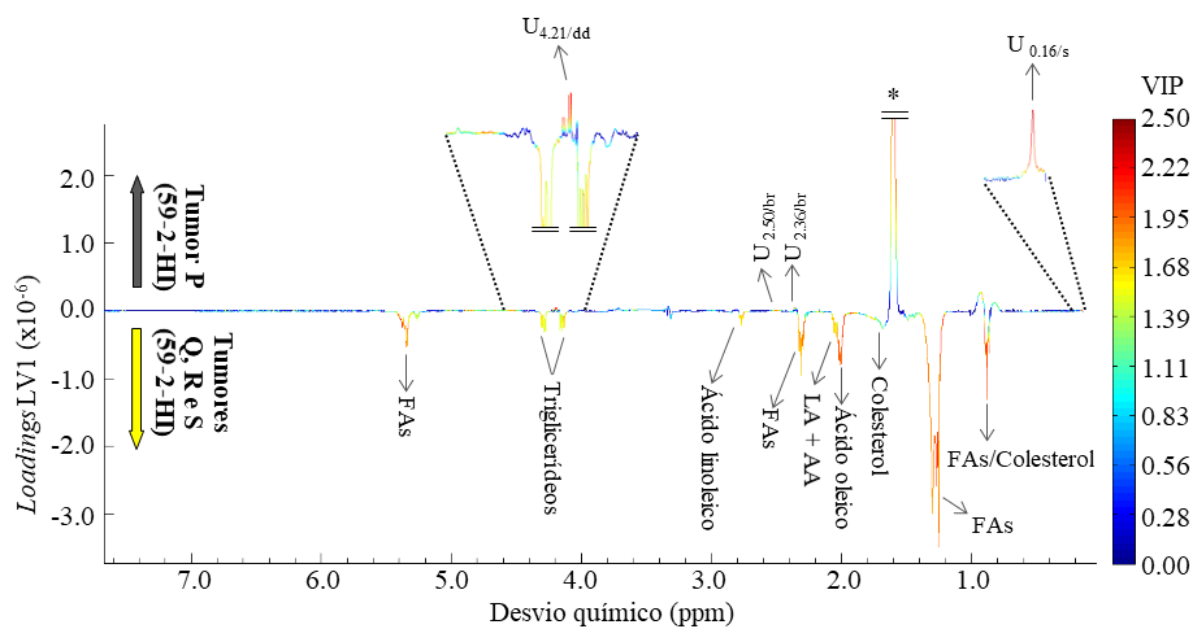


Figura 41 – Diagrama de *loadings* de LV1 do modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos lipídicos dos tumores Q, R e S com o tumor P (ambos 59-2-HI). A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja), destacando-se com um asterisco (*) um sinal que se pensa ser proveniente de uma contaminação de água. Os metabolitos aumentados no tumor P e nos tumores Q, R e S identificaram-se, respetivamente, nas regiões positiva e negativa do eixo *Loadings* LV1. AA, ácido araquidónico; FAs, ácidos gordos; LA, ácido linoleico

Tabela 11 - Metabolitos lipofílicos estatisticamente diferentes entre os tumores P (n=4 octantes) e Q, R e S (n=12 octantes) do tipo 59-2-HI. Neste caso, os metabolitos com ES positivo e negativo encontraram-se aumentados, respetivamente, no tumor P e nos tumores Q, R e S. **a,b)** Informação detalhada na Tabela 7. **c)** valores de *p-value* que deixaram de ser estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um *cutoff* de $\frac{0.05}{5} = 1.00 \times 10^{-2}$.

$\delta^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	p-value ^b
2.01 (m)	Ácido oleico	-2.68 ± 1.46	3.61×10^{-3}
2.05 (m)	Ácidos linoleico e araquidónico	-1.85 ± 1.30	$1.09 \times 10^{-2\text{c}}$
2.77 (t)	Ácido linoleico	-1.79 ± 1.29	7.63×10^{-3}
0.16 (s)	U _{0.16/s}	3.98 ± 1.78	3.61×10^{-3}
4.21 (dd)	U _{4.21/dd}	2.14 ± 1.35	$1.09 \times 10^{-2\text{c}}$

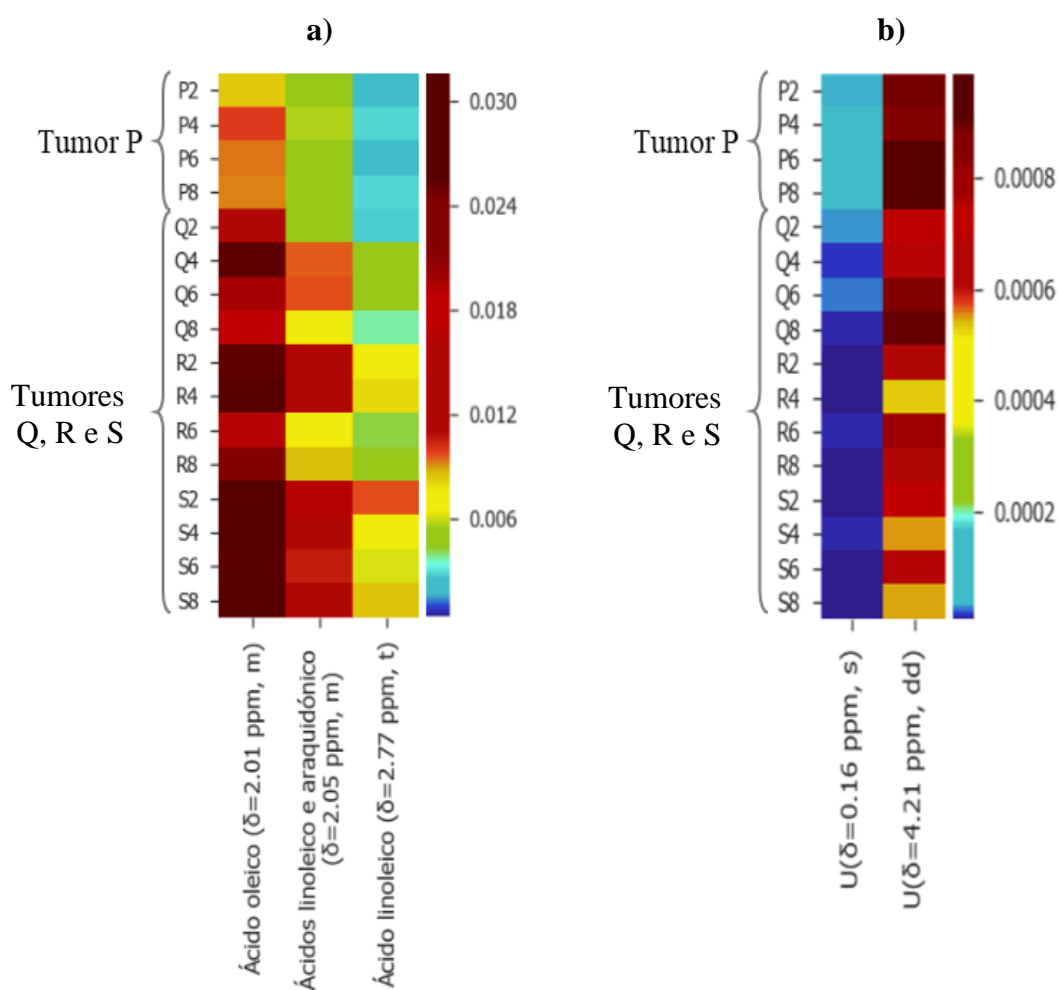


Figura 42 - *Heatmap* representativo das quantidades relativas dos principais metabolitos lipofílicos conhecidos (a) e desconhecidos (b) que diferem entre os tumores do tipo 59-2-HI: Q, R e S vs. P. Nas linhas e colunas apresentam-se, respetivamente, os octantes tumorais analisados por RMN de ^1H e os metabolitos seleccionados. A escala de cores foi atribuída da integração normalizada máxima (vermelho escuro) à mínima (azul escuro). **dd**, duplo duplete; **m**, multiplete; **s**, singlete; **t**, tripleto.

Apesar do tumor P ter apresentado FAs com grau de insaturação significativamente inferior aos tumores Q, R e S (excluindo o octante Q2 do tumor Q - Figura 43a), revelou um grau de poliinsaturação idêntico aos restantes tumores 59-2-HI (Figura 43b). Além disso, os FAs presentes no tumor P apresentaram um comprimento significativamente menor e mais homogêneo entre os octantes analisados (Figura 43c), tendo um menor desvio padrão associado a este parâmetro. O tumor R destaca-se pela maior homogeneidade intra-tumoral de grau de insaturação. Já o tumor Q mostrou um desvio padrão claramente superior nos graus de insaturação e poliinsaturação, devido aos valores inferiores relativos ao octante Q2.

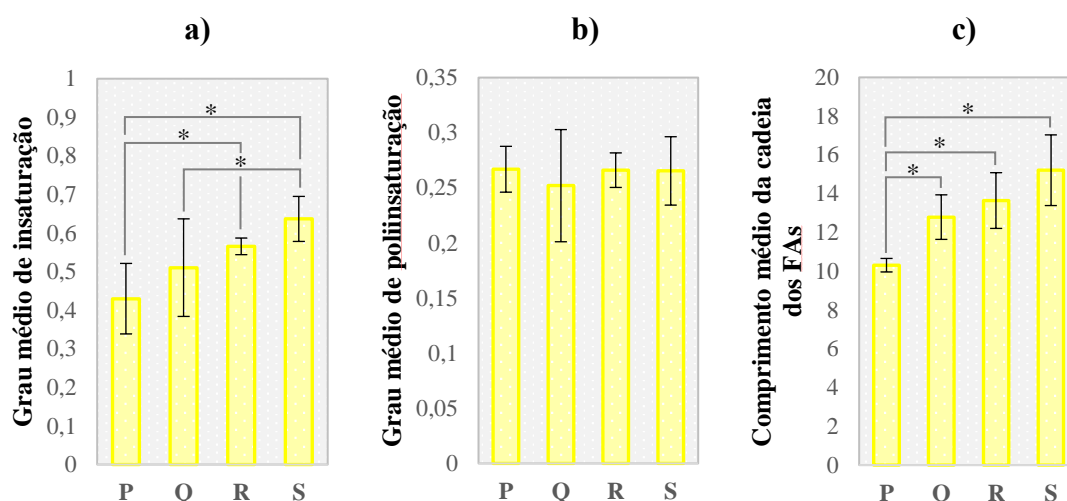


Figura 43 - Representação gráfica de parâmetros calculados com base nos espectros de RMN de ^1H de extratos lipídicos de tumores mamários P, Q, R e S do tipo 59-2-HI: **a)** grau médio de insaturação (Integração[$\text{HC}=\text{CH}$]/Integração[$-\text{CH}_3$]); **b)** grau médio de poliinsaturação (Integração[$=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$]/Integração[$-\text{CH}_3$]); **c)** comprimento médio da cadeia dos FAs expresso em grupos $-\text{CH}_2$ (Integração[$-\text{CH}_2$]/Integração[$(\text{CH}_2)_n$]). Os parâmetros que diferiram de forma estatisticamente significativa entre os tumores ($p\text{-value} < 0.05$ no teste *Wilcoxon Rank-sum*) foram destacados com um asterisco (*). Note-se que se apresentam os cálculos incluindo o octante Q2, sendo que a sua exclusão tornou o grau de insaturação do tumor P estatisticamente distinto de Q. FAs, ácidos gordos.

3.2.2.3. Interpretação bioquímica

Tendo em conta que a maioria das diferenças metabólicas significativas entre o tumor P e os restantes tumores do tipo 59-2-HI também foram relevantes na comparação entre os diferentes tipos de tumores (Figura 44), grande parte da interpretação bioquímica realizada no subcapítulo 3.2.1.3. é aplicável no presente modelo. De forma geral, estas alterações metabólicas poderão significar que, relativamente aos tumores Q, R e S, o tumor P aparenta possuir maior agressividade e capacidade proliferativa/metastática. Um aspeto importante destacado com sublinhados na Figura 44 foram as variações entre os tipos de tumores que permaneceram significativas comparando diretamente o tumor P (59-2-HI) e os tumores T, U e V (C7-2-HI), sendo estas possivelmente as mais representativas do tipo 59-2-HI. Em seguida serão discutidas apenas as variações metabólicas que ainda não foram interpretadas neste trabalho.

Contrariamente aos restantes aminoácidos que variaram significativamente neste modelo, apenas a Tau esteve diminuída no tumor P (relativamente aos tumores Q, R e S). Considerando que diversos estudos em BCa demonstraram que este aminoácido funcionava como agente apoptótico, anti-proliferativo e anti-angiogénico [258,259], poderá supor-se que P seria o tumor do tipo 59-2-HI mais protegido contra os seus efeitos anti-tumorais. À semelhança do *myo*-inositol, sabe-se que a Tau também funciona como osmorregulador do volume celular [260], sendo que ambos os metabolitos se encontraram diminuídos no tumor P em relação com os tumores Q, R e S.

Tumores T, U e V (relativamente aos tumores Q, R e S)		Tumor P (relativamente aos tumores Q, R e S)	
<i>Metabolitos energéticos</i>			
↓	<u>Piruvato</u>	↑	
=	Lactato*	↑	
↓	<u>Citrato, succinato e fumarato</u>	=	
<i>Aminoácidos</i>			
↑	<u>Maioria dos aminoácidos</u>	↑	
↓	<u>Glutamato</u>	=	
=	Taurina*	↓	
<i>Nucleótidos e derivados</i>			
↑	<u>Uridina</u>	↓	
↓	Uracilo, Hipoxantina	=	
↓	Adenosina/Inosina	↓	
<i>Colina e derivados</i>			
↑	Fosfocolina, Colina, Etanolamina	↓	
↓	<u>GPC</u>	=	
<i>Lípidos</i>			
↓	Esfingomielina	=	
=	Ácidos gordos*	↓	
<i>Outros metabolitos</i>			
↑	Acetona	=	
↓	Creatina	↓	
=	Formato*	↑	
↓	Glicerol	↓	
↑	<u>myo-inositol</u>	↓	
↑	<u>scyllo-inositol</u>	=	

Figura 44 – Representação esquemática das principais diferenças metabólicas entre os tumores T, U e V e os tumores Q, R e S (esquerda) e entre o tumor P e os tumores Q, R e S (direita). Os sublinhados destacam as variações entre os tipos de tumores que permanecem relevantes comparando diretamente o tumor P (59-2-HI) e os tumores T, U e V (C7-2-HI). ↑ e ↓, aumento e diminuição dos níveis dos metabolitos; =, metabolitos sem variação significativa entre as classes; *, compostos que apresentaram relevância estatística pela primeira vez neste modelo.

Comparativamente aos tumores Q, R e S, a quantidade inferior de FAs do tumor P poderá refletir a sua menor internalização/síntese ou maior β-oxidação [31]. Como todos os tumores 59-2-HI exibiram

níveis idênticos dos intermediários do ciclo de *Krebs*, o aumento de acetil-CoA resultante da eventual β -oxidação dos FAs podia ser convertido em piruvato, que realmente esteve mais aumentado no tumor P. Além disso, os FAs do tumor P (em comparação com os tumores Q, R e S) caracterizaram-se por serem mais curtos e saturados, podendo indicar menor expressão/atividade de elongases e dessaturases que atuam nos FAs saturados resultantes da biossíntese *de novo*. Considerando que o tumor P apresentou um menor grau de insaturação total, mantendo um grau de poliinsaturação equivalente aos tumores Q, R e S, ponderou-se se este apresentava um menor teor de MUFAs (FAs monoinsaturados). De facto, observou-se níveis inferiores de ácido oleico (o principal MUFA) no tumor P em relação aos tumores Q, R e S, o que poderá refletir a menor: **a)** biossíntese de FAs saturados em P, por exemplo, devido à menor expressão/atividade da FA sintase, uma enzima frequentemente sobre-expressa no BCa e relacionada com a proliferação, sobrevivência, migração e invasão de células tumorais [261]; e/ou **b)** expressão/atividade da estearoil-CoA dessaturase 1 (permite obter ácido oleico ao introduzir uma ligação dupla na posição $\Delta 9$ do ácido esteárico) em P [262]. Ainda que todos os tumores 59-2-HI apresentassem um grau de poliinsaturação equivalente, os tumores Q, R e S mostraram maior riqueza em ácido linoleico (FA essencial poliinsaturado), podendo significar: **a)** que os murganhos com os tumores Q, R e S ingeriram alimentos mais ricos neste FA que o murganho com o tumor P, o que seria improvável já que todos os animais foram expostos às mesmas condições; **b)** o tumor P tinha menos acesso ao ácido linoleico ingerido devido, possivelmente, à menor expressão/atividade de transportadores deste FA ou ao menor grau de vascularização [263]. Os diferentes níveis de FAs podiam influenciar: **a)** a quantidade e/ou tipo de FAs que se encontravam livres nas células tumorais, tendo-se reportado que o aumento de FAs livres saturados e insaturados induziam, respetivamente, a apoptose e proliferação de células de BCa MDA-MB-231 [264]; **b)** quantidade dos fosfolípidos, todavia estes tiveram níveis semelhantes em todos os tumores 59-2HI, considerando-se apenas o eventual efeito das alterações dos FAs na composição dos fosfolípidos; **c)** a quantidade de triglicerídeos, sendo que os níveis inferiores de FAs em P (em relação aos tumores Q, R e S) foram acompanhados pela diminuição tendencial de triglicerídeos e também de glicerol.

Ainda que o formato possa provir de várias fontes (como o catabolismo de triptofano ou o metabolismo de metanol), os estudos geralmente focam-se na obtenção deste metabolito a partir do metabolismo do folato dada a sua relevância em diversos processos celulares (como a síntese de nucleótidos purínicos) [265]. A conversão de serina em glicina representa uma importante fonte de carbonos para o metabolismo do folato. De facto, verificou-se que o aumento de glicina no tumor P (em relação aos tumores Q, R e S) esteve aliado à elevação dos níveis de formato. Sugeriu-se que níveis elevados de formato (proveniente do metabolismo do folato) promoviam a capacidade invasiva de diversos tipos de tumor (incluindo o BCa) [266]. Tal como já foi explorado no modelo anterior (Q, R e S vs. T, U e V), a

tendência para o aumento do nível de acetona em P (comparativamente aos tumores Q, R e S) também podia sugerir que este tumor apresentava maior capacidade invasiva, bem como maior capacidade proliferativa [245,246].

Tal como já foi referido, os tumores analisados na presente tese foram armazenados há mais de uma década. Entre os tumores 59-2-HI, apenas o P foi recolhido em 2006, tendo-se obtido os restantes em 2008. Assim, ponderou-se que a exposição do tumor P às condições de armazenamento durante mais tempo podia promover as alterações metabólicas que o diferenciaram do tumores Q, R e S. Segundo Righi *et al.* [232], o aumento do tempo de armazenamento a -80°C de tecido tumoral mamário contribuía para níveis superiores de colina e inferiores de Tau. O tumor P exibiu, de facto, um teor de Tau inferior aos outros tumores 59-2-HI, mas apresentou níveis superiores de Colina. Ainda que não explicasse as alterações metabólicas observadas, a possibilidade de que os diferentes tempos de armazenamento tivessem alguma contribuição não foi totalmente descartada já que o estudo acima mencionado apenas considerou a evolução do perfil metabólico no decorrer de um ano de armazenamento.

Relação dos elementos do microambiente tumoral com o perfil metabólico

Nesta secção pretende-se explorar o modo como os elementos do microambiente tumoral podem ser influenciados pelas variações metabólicas relevantes neste modelo e que ainda não foram discutidas no capítulo anterior.

Pensa-se que os níveis mais elevados de lactato observados no tumor P (relativamente aos tumores Q, R e S) provavelmente promoveram um microambiente tumoral mais agressivo ao atuar em praticamente todos os seus componentes [267]: **a)** nas células tumorais (epiteliais) que o produzem, o lactato remodela a transcrição genética (*e.g.* ao elevar a expressão de transportadores MCT, o lactato promove a sua própria secreção e, portanto, o estado de acidose láctica extracelular); **b)** induz a migração de células endoteliais cancerígenas e, consequentemente, a angiogénese; **c)** contribui para a ativação alternativa dos macrófagos associados ao tumor e a supressão da resposta imune anti-tumoral.

Visto que uma das diferenças metabólicas mais importantes entre os tumores Q, R e S e o tumor P correspondeu aos diferentes níveis de FAs, importa referir o papel dos adipócitos neste contexto. À semelhança do que ocorre com os fibroblastos e macrófagos, também os adipócitos do microambiente tumoral mamário podem sofrer alterações metabólicas, sendo convertidos em CAAs (adipócitos associados ao cancro), que são responsáveis pelo fornecimento de FAs às células tumorais [268]. Especificamente no BCa verificou-se que, relativamente aos adipócitos não ativados, os CAAs sobre-expressavam citocinas inflamatórias, exibiam menores dimensões e apresentavam várias características de dediferenciação (como a sub-expressão de marcadores adipogénicos). Considerando a contribuição do conteúdo dos adipócitos para o perfil metabólico dos tumores analisados e que o tumor P apresentou menor

teor de FAs e triglicerídeos (relativamente aos tumores Q, R e S), poderá ponderar-se que este exibiu menor riqueza de adipócitos.

3.2.3. Comparação entre tumores do tipo C7-2-HI

3.2.3.1. Análise de extratos aquosos

Relativamente aos tumores C7-2-HI, começou por se investigar a variabilidade entre os tumores deste tipo através de uma PCA (Figura 45a). No diagrama de *scores* obtido, apenas o octante T2 do tumor T se destacou mais claramente dos outros pontos. Além disso, realizaram-se PLS-DAs comparando cada tumor com os restantes do tipo C7-2-HI (T vs. U e V, U vs. T e V e V vs. T e U). Contrariamente ao que ocorreu com as PLS-DAs realizadas para comparar os tumores Q, R e S (onde nenhuma comparação se associou a $Q^2 > 0.400$), neste caso dois dos modelos obtidos possuíram uma robustez razoável: **a)** T vs. U e V ($Q^2 = 0.549$ – Figura 45b); **b)** V vs. T e U ($Q^2 = 0.480$ – Figura 47a). Tal comprovou a menor semelhança metabólica entre tumores do tipo C7-2-HI, comparativamente com os tumores Q, R e S do tipo 59-2-HI.

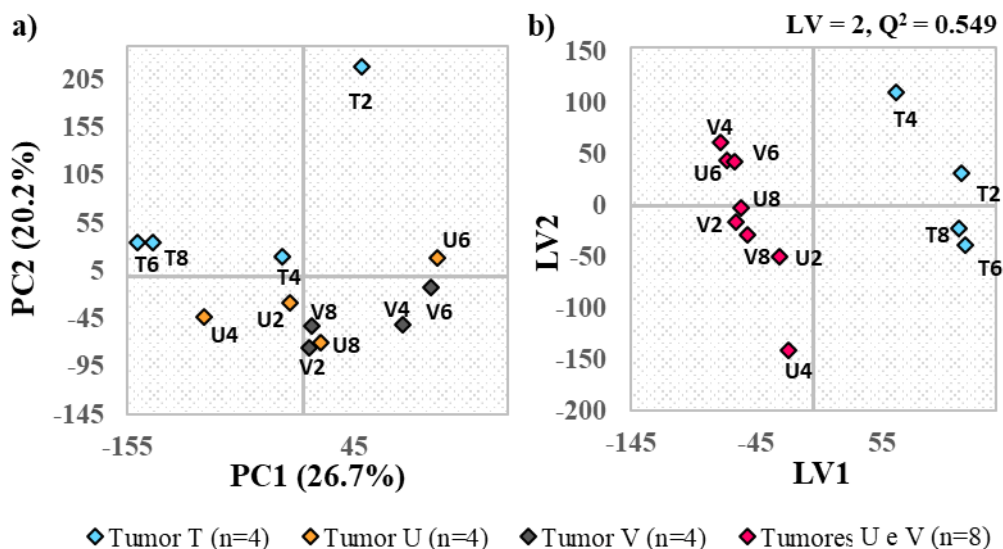


Figura 45 – Diagramas de *scores* de PCA (**a**, com os tumores T (♦), U (♦) e V (♦)) e PLS-DA (**b**, T (♦) vs. U e V (♦)) dos espetros de RMN de ^1H dos extratos lipídicos dos tumores mamários do tipo C7-2-HI. Em nenhum dos modelos estatísticos se incluíram as regiões espectrais dos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), do metanol (3.57-3.36 ppm) e do TMS (0.15-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q²**, coeficiente de relevância preditiva.

Na Figura 46a,b apresenta-se o diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA onde se compararam os tumores U e V com o tumor T, destacando-se as principais diferenças metabólicas.

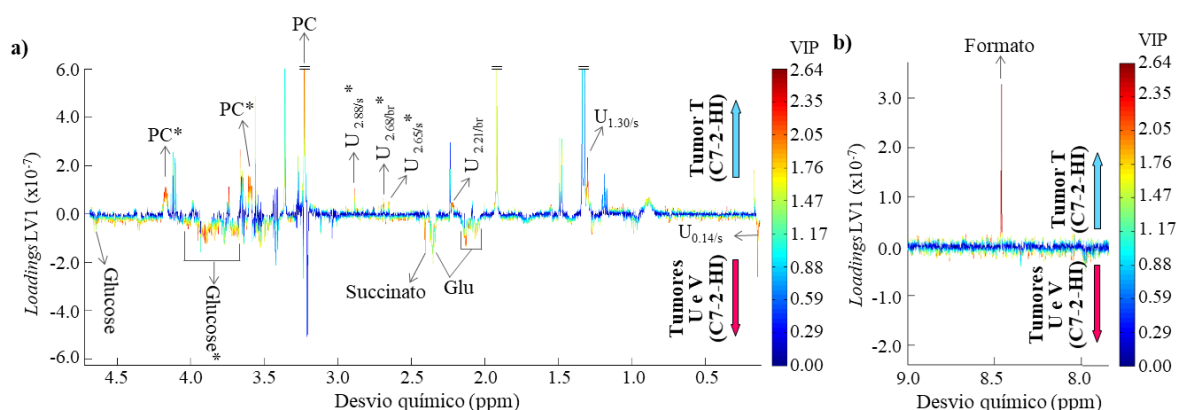


Figura 46 – Diagrama de *loadings* de LV1 do modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos aquosos dos tumores U e V com o tumor T, representando-se as regiões espectrais de baixo (**a**, 0.13-4.70 ppm) e alto desvio químico (**b**, 8.00-9.00 ppm). A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja), destacando-se com um asterisco (*) aqueles que se encontravam numa zona de muita sobreposição. Os metabolitos aumentados no tumor T e nos tumores U e V identificaram-se, respetivamente, nas regiões positiva e negativa do eixo *Loadings* LV1. PC, fosfocolina.

Na Tabela 12 constata-se que, comparativamente aos tumores U e V, o tumor T apresentou níveis estatisticamente: **a)** aumentados de fosfocolina, formato e alguns metabolitos desconhecidos ($U_{1.30/s}$, $U_{2.21/br}$, $U_{2.68/br}$ e $U_{2.88/s}$); **b)** diminuídos de succinato e $U_{0.14/s}$.

Tabela 12 - Metabolitos hidrofílicos estatisticamente diferentes entre o tumor T (n=4 octantes) e os tumores U e V (n=8 octantes) do tipo C7-2-HI. Neste caso, os metabolitos com ES positivo e negativo encontraram-se aumentados, respetivamente, no tumor T e nos tumores U e V. **a,b)** Informação detalhada na Tabela 7. **c)** Todos os valores de *p-value* deixaram de ser estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um *cutoff* de $\frac{0.05}{9} = 5.56 \times 10^{-3}$.

δ^1H/ppm (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	p-value ^{b,c}
2.41 (s)	Succinato	-2.53 ± 1.57	6.58×10^{-3}
3.22 (s)	Fosfocolina	2.37 ± 1.53	6.58×10^{-3}
3.63 (t)	<i>myo</i> -inositol	2.19 ± 1.49	1.08×10^{-2}
8.46 (s)	Formato	8.23 ± 3.51	6.58×10^{-3}
0.14 (s)	$U_{0.14/s}$	-2.22 ± 1.49	6.58×10^{-3}
1.30 (s)	$U_{1.30/s}$	3.43 ± 1.82	6.58×10^{-3}
2.21 (br)	$U_{2.21/br}$	2.55 ± 1.58	6.58×10^{-3}
2.68 (br)	$U_{2.68/br}$	2.08 ± 1.46	6.58×10^{-3}
2.88 (s)	$U_{2.88/s}$	2.07 ± 1.46	6.58×10^{-3}

A Figura 47b mostra o diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA onde se evidenciaram as principais diferenças metabólicas entre os tumores T e U e o tumor V.

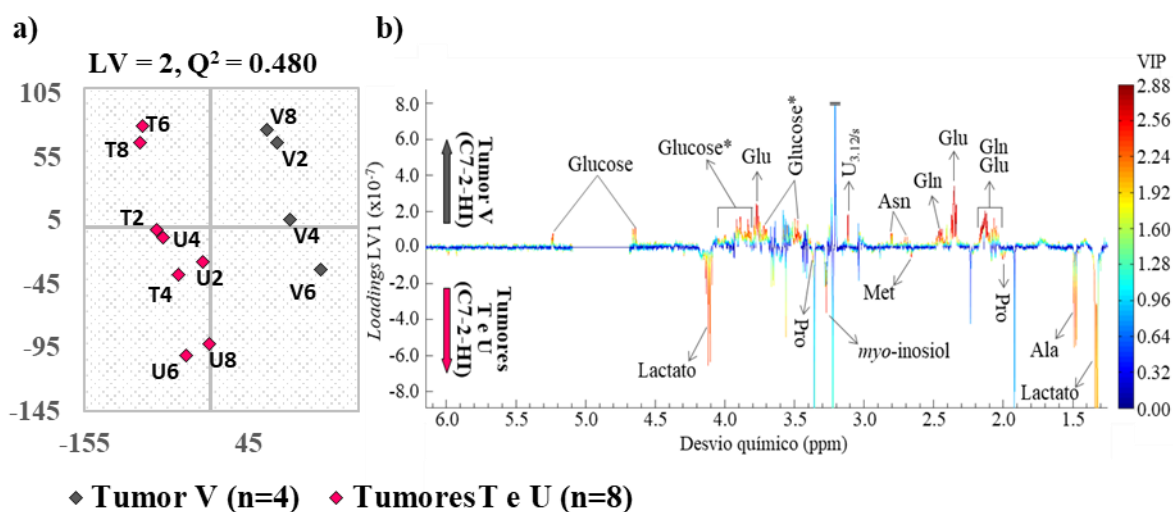


Figura 47 – Modelo PLS-DA onde se compararam os perfis metabólicos dos extratos aquosos dos tumores mamários do tipo C7-2-HI: V (◆) vs. T e U (◆). **a)** Diagrama de *scores*; **b)** Diagrama de *loadings* de LV1. A escala de cores foi atribuída de acordo com a importância das variáveis na projeção (VIP). Os principais metabolitos que variaram entre os grupos foram identificados (representados a vermelho/laranja), destacando-se com um asterisco (*) aqueles que se encontravam numa zona de muita sobreposição. Os metabolitos aumentados no tumor V e nos tumores T e U identificaram-se, respetivamente, nas regiões positiva e negativa do eixo *Loadings* LV1.

Segundo a Tabela 13, em relação aos tumores T e U, o tumor V caracterizou-se por níveis estatisticamente: **a)** aumentados de certos aminoácidos não essenciais (Gln e Glu), glucose e U_{3,12/s}; **b)** diminuídos de alguns aminoácidos não essenciais (Ala e Pro) e lactato.

Tabela 13 - Metabolitos hidrofílicos estatisticamente diferentes entre o tumor V (n=4 octantes) e os tumores T e U (n=8 octantes) do tipo C7-2-HI. Neste caso, os metabolitos com ES positivo e negativo encontraram-se aumentados, respetivamente, no tumor V e nos tumores T e U. **a,b)** Informação detalhada na Tabela 7. **c)** valores de *p-value* que deixaram de ser estatisticamente significativos após a correção de *Bonferroni*, neste caso com um $\text{cutoff} \frac{0.05}{7} = 7.14 \times 10^{-3}$.

$\delta^1\text{H/ppm}$ (multiplicidade)	Metabolitos	Effect size ^a	p-value ^b
1.48 (d)	Alanina	-2.39 ± 1.54	$1.74 \times 10^{-2\text{c}}$
2.03 (m)	Prolina	-2.51 ± 1.57	$1.74 \times 10^{-2\text{c}}$
2.36 (m)	Glutamato	5.06 ± 2.35	6.58×10^{-3}
2.46 (m)	Glutamina	3.39 ± 1.81	6.58×10^{-3}
4.11 (q)	Lactato	-2.42 ± 1.54	$1.08 \times 10^{-2\text{c}}$
5.24 (d)	Glucose	2.60 ± 1.59	$1.08 \times 10^{-2\text{c}}$
3.12 (s)	U _{3,12/s}	3.90 ± 1.97	6.58×10^{-3}

3.2.3.2. Análise de extratos lipídicos

Também se explorou a variabilidade entre tumores C7-2-HI em termos de metabolitos lipofílicos. Ainda que na PCA nenhum dos tumores se tenha destacado (Figura 48a), realizaram-se PLS-DAs comparando cada tumor com os restantes (T vs. U e V, U vs. T e V, V vs. T e U), sendo que apenas o modelo V vs. T e U (Figura 48b) apresentou robustez razoável ($Q^2 = 0.443$).

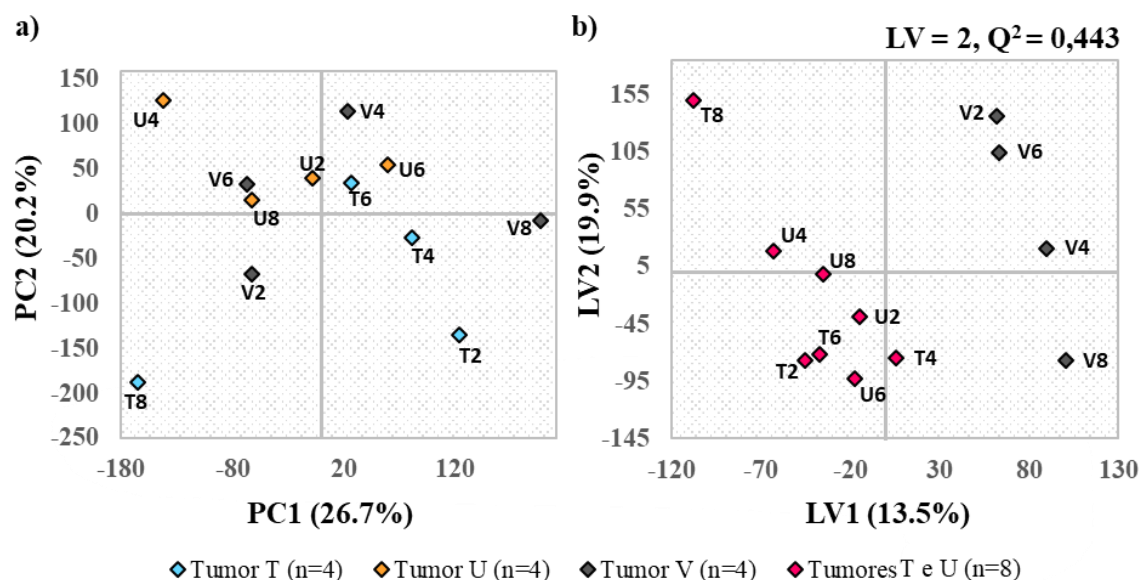


Figura 48 – Diagramas de *scores* de PCA (a, com os tumores T (♦), U (♦) e V (♦)) e PLS-DA (b, V (♦) vs. T e U (♦)) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos lipídicos dos tumores mamários do tipo C7-2-HI. Em nenhum dos modelos estatísticos se incluíram as regiões espectrais dos sinais do clorofórmio (7.50-6.96 ppm), do metanol (3.57-3.36 ppm) e do TMS (0.15-0.00 ppm). **PC1/PC2**, componentes principais 1 e 2; **LV1/LV2**, variáveis latentes 1 e 2; **Q^2** , coeficiente de relevância preditiva.

A análise do diagrama de *loadings* de LV1 da PLS-DA (resultados não mostrados) demonstrou que o tumor V apenas se distinguia de T e U por possuir o metabolito $\text{U}_{0.83/\text{m}}$ aumentado. Apesar desta diferença exibir relevância estatística ($p\text{-value} < 0.05$, teste *Wilcoxon Rank-sum*), o seu ES (-1.72 ± 1.38) apresentou muito erro associado ($> 75\%$).

Tal como se pode observar Figura 49, o tumor V exibiu FAs com um grau de insaturação mais homogêneo que os restantes tumores C7-2-HI (Figura 49a), um grau de poliinsaturação estatisticamente superior ao tumor T (Figura 49b) e um comprimento tendencialmente superior (Figura 49c). O tumor U destacou-se por apresentar FAs com maior variabilidade de graus de insaturação e poliinsaturação. Já o tumor T possuiu FAs com um comprimento de cadeia mais homogêneo.

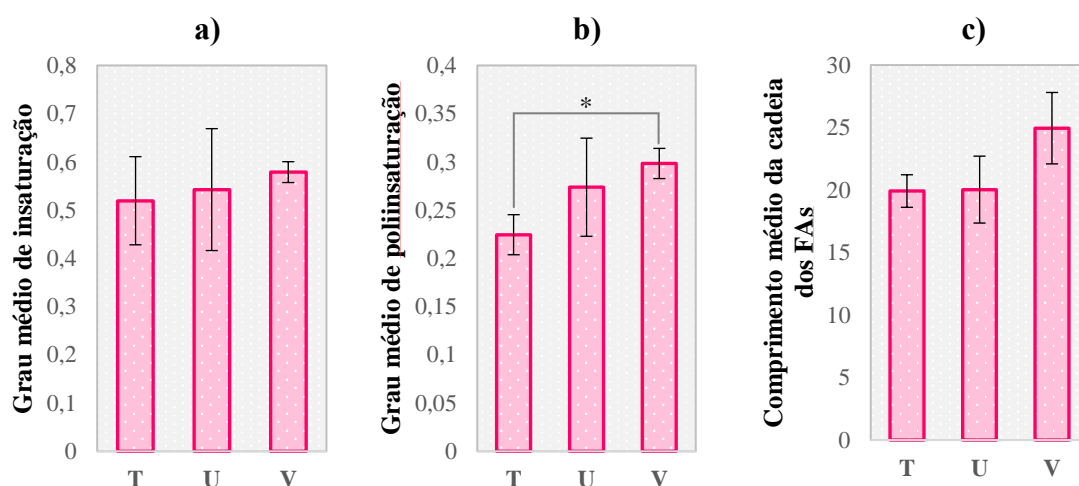


Figura 49 - Representação gráfica de parâmetros calculados com base nos espectros de RMN de ^1H de extratos lipídicos de tumores mamários T, U e V do tipo C7-2-HI: **a)** grau médio de insaturação (Integração[$\text{HC}=\text{CH}$]/Integração[$-\text{CH}_3$]); **b)** grau médio de poliinsaturação (Integração[$=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$]/Integração[$-\text{CH}_3$]); **c)** comprimento médio da cadeia dos FAs expresso em grupos $-\text{CH}_2$ (Integração[$-\text{CH}_2$]/Integração[$(^2\text{CH}_3)$]). Os parâmetros que diferiram de forma estatisticamente significativa entre os tumores ($p\text{-value} < 0.05$ no teste *Wilcoxon Rank-sum*) foram destacados com um asterisco (*). **FAs**, ácidos gordos.

3.2.3.3. Interpretação bioquímica

Contrariamente ao que ocorreu na comparação entre os tumores 59-2-HI, onde o tumor P se destacava claramente dos restantes, os tumores do tipo C7-2-HI apresentaram menos variações metabólicas significativas entre si, sendo estas apenas em termos de metabolitos hidrofílicos. Os possíveis significados/efeitos da maioria das variações metabólicas observada entre os tumores C7-2-HI já foi discutida anteriormente neste trabalho. Salienta-se que cada um dos tumores T e V se distinguiu dos restantes do tipo C7-2-HI por razões distintas: enquanto que as principais diferenças associadas ao tumor V se relacionaram com os níveis de alguns aminoácidos (Ala, Gln, Glu e Pro) e metabolitos envolvidos na glicólise e fermentação láctica (glucose e lactato), as diferenças relacionadas com o tumor T corresponderam a outros metabolitos (formato, *myo*-inoitol, PC e succinato). Destaca-se também os níveis superiores de lactato e Ala e inferiores de glucose nos tumores T e U comparativamente a V, possivelmente refletindo uma maior capacidade proliferativa e invasiva destes tumores.

3.3. Resultados preliminares da avaliação da heterogeneidade metabólica intra-tumoral

Neste subcapítulo descreve-se a abordagem utilizada para comparar os espectros de RMN de ^1H de extratos aquosos e lipídicos dos 4 octantes de cada tumor analisado. Para determinar as principais diferenças metabólicas dentro de cada tumor recorreu-se principalmente à inspeção visual dos espectros e ao cálculo do desvio padrão relativo (RSD - Equação 9) com base nas integrações normalizadas de cada metabolito.

Através da inspeção visual dos 4 espectros aquosos correspondentes a cada tumor estudado, selecionaram-se os sinais com maior heterogeneidade intra-tumoral aparente. Esta estratégia é exemplificada na Figura 50, onde se comparou uma secção dos espectros dos octantes do tumor P, destacando-se os sinais com maior variabilidade.

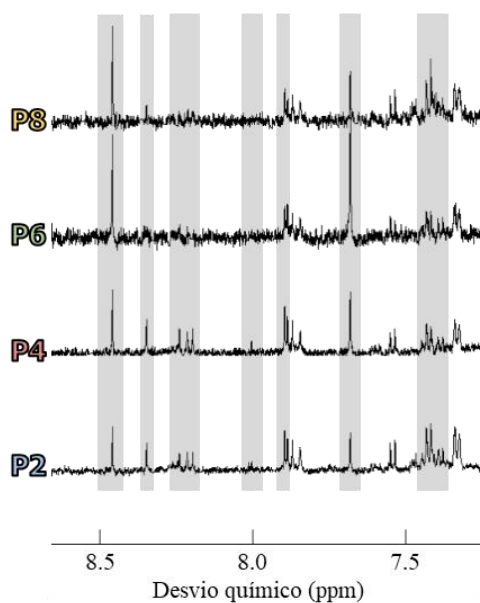


Figura 50 - Perfil metabólico dos octantes do tumor P analisados por RMN de ¹H com destaque dos picos com heterogeneidade intra-tumoral visualmente evidente (cinzento).

Em seguida, construiu-se um *heatmap* representativo da percentagem do RSD dos metabolitos hidrofílicos com maior variação intra-tumoral (Figura 51), sendo que a escala de cores foi atribuída da menor (roxo claro) à maior percentagem de RSD (roxo escuro). Para este gráfico selecionaram-se apenas os metabolitos com RSD > 20% em, pelo menos, um dos tumores analisados. Cada célula do *heatmap* representa o grau de heterogeneidade relativa de um dado metabolito (expressa em % de RSD) num certo tumor. Constatou-se que o tumor P apresentava uma heterogeneidade intra-tumoral claramente superior, sendo o tumor com mais metabolitos hidrofílicos a roxo escuro. Além deste, os restantes tumores 59-2-HI demonstraram uma variabilidade intra-tumoral aparentemente semelhante entre si. Pôde ainda observar-se que, comparativamente com os tumores Q, R e S, os tumores C7-2-HI mostraram menor heterogeneidade intra-tumoral aparente por terem apresentado mais metabolitos com RSD < 20%. Contudo, uma inspeção mais detalhada dos dados permitiu verificar que, relativamente aos tumores Q, R e S, os tumores C7-2-HI apresentaram mais metabolitos com uma variação intra-tumoral acentuada (RSD > 40%). Tal poderá ter contribuído para a maior dispersão dos octantes dos tumores C7-2-HI (comparativamente com os tumores Q, R e S) observada nos modelos estatísticos da Figura 24a,b.

De facto, verificou-se que alguns metabolitos (como adenosina/inosina, fumarato e $U_{7.68/s}$) apresentaram valores de RSD muito superiores a quaisquer variações observadas dentro de cada tumor Q, R e S.

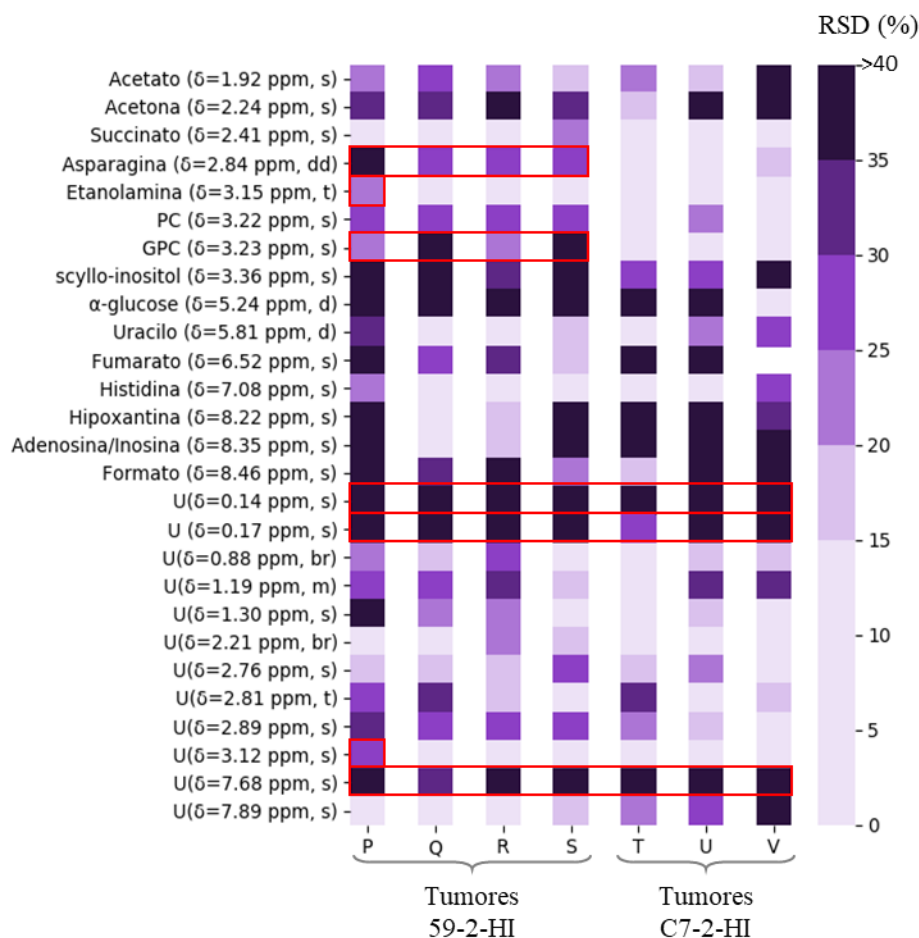


Figura 51 - Heatmap representativo do RSD dos metabolitos hidrofílicos com maior variação intra-tumoral (RSD > 20% em, pelo menos, um dos tumores analisados). Nas linhas e colunas apresentam-se, respetivamente, os metabolitos seleccionados e os tumores dos tipos 59-2-HI e C7-2-HI. A escala de cores foi atribuída do menor (roxo claro) ao maior (roxo escuro) RSD (%). Os retângulos vermelhos destacam variações intra-tumorais elevadas que serão discutidas em seguida. **PC**, fosfocolina; **GPC**, glicerosfosfocolina; **RSD**, desvio padrão relativo.

No heatmap da Figura 51 denotou-se a existência de metabolitos com elevada variação intra-tumoral: **a)** em todos os tumores analisados independentemente do seu tipo (como $U_{0.14/s}$, $U_{0.17/s}$ e $U_{7.89/s}$); **b)** apenas num tipo de tumores (*e.g.* a asparagina e a GPC exibiram níveis de RSD > 20% somente nos tumores 59-2-HI), o que poderia refletir alterações oncogénicas específicas de cada tipo e/ou a sua maior adaptabilidade a certos contextos; **c)** em tumores específicos (*e.g.* a etanolamina e o $U_{3.12/s}$ apresentaram níveis de RSD > 20% apenas no tumor P). Todos estes aspetos comprovam a dificuldade em encontrar/validar biomarcadores metabólicos clinicamente relevantes e a importância de terapias personalizadas.

Procedendo-se de igual forma para os extratos lipídicos, obteve-se o *heatmap* da Figura 52 colorido de acordo a percentagem do RSD. Contrariamente ao que se verificou na análise dos extratos aquosos, neste caso o P foi o tumor que exibiu maior homogeneidade intra-tumoral, sendo aquele com mais metabolitos lipofílicos a roxo claro. Desta forma comprovou-se a suspeita inicial de que a heterogeneidade deste tumor não afetava tanto a sua composição lipídica. Constatou-se também que, relativamente aos tumores 59-2-HI, os C7-2-HI demonstraram uma variabilidade intra-tumoral claramente superior.

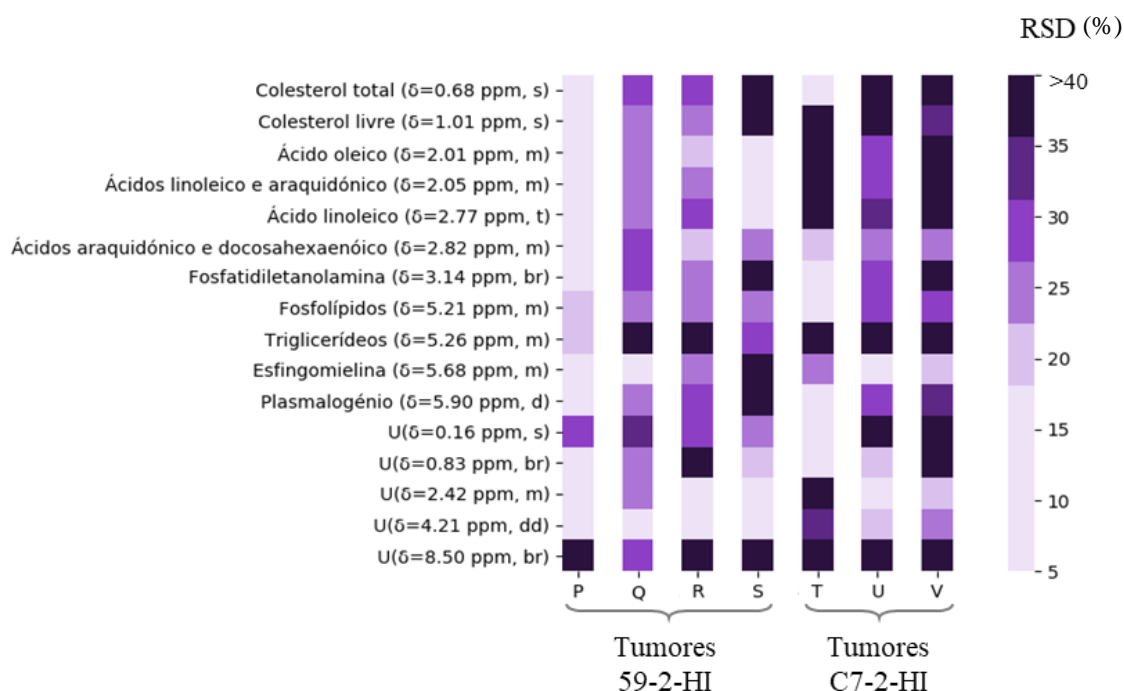


Figura 52 - *Heatmap* representativo do RSD dos metabolitos lipofílicos com maior variação intra-tumoral (RSD > 20% em, pelo menos, um dos tumores analisados). Nas linhas e colunas apresentam-se, respetivamente, os metabolitos seleccionados e os tumores dos tipos 59-2-HI e C7-2-HI. A escala de cores foi atribuída do menor (roxo claro) ao maior (roxo escuro) RSD. **RSD**, desvio padrão relativo.

Análise do perfil metabólico de cada octante tumoral do tumor P

A determinação do nível relativo de heterogeneidade intra-tumoral com base no RSD dos metabolitos permitiu verificar que compostos variavam mais em cada tumor, contudo não forneceu informações específicas acerca do comportamento metabólico dos octantes tumorais individuais. De facto, um tumor podia possuir apenas um octante muito distinto que iria aumentar os valores RSD, mesmo que os restantes octantes fossem metabolicamente semelhantes entre si. Tendo em conta o elevado grau de heterogeneidade de metabolitos hidrofílicos presente no tumor P, nesta secção decidiu-se comparar o

perfil metabólico de cada um dos seus octantes.

Primeiramente, assumiu-se que a quantidade relativa total de cada metabolito no tumor P (100%) correspondia à soma das integrações normalizadas desse metabolito em P2, P4, P6 e P8. Deste modo, nos tumores totalmente homogêneos para determinado metabolito, cada um dos 4 octantes analisados possuía 25% da quantidade relativa desse metabolito. Posteriormente, selecionaram-se todos os compostos com uma quantidade relativa < 20% ou > 30% em algum dos octantes, destacando-se em cada octante de P (Figura 53) os metabolitos muito aumentados (> 35%), aumentados (30-35%), diminuídos (15-20%) e muito diminuídos (< 15%).

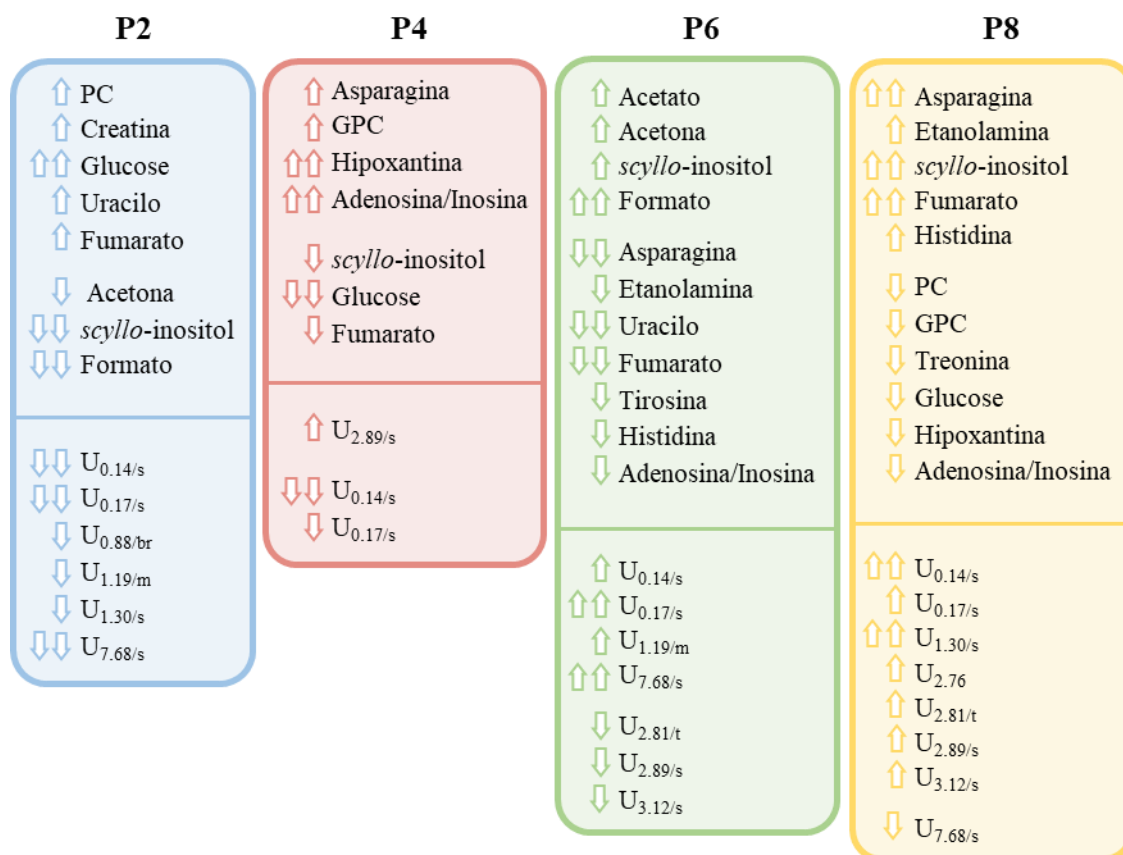


Figura 53 - Esquematização dos principais metabolitos hidrofílicos que variam entre os octantes do tumor P: P2 (azul), P4 (rosa), P6 (verde), P8 (amarelo). Assumiu-se que a quantidade relativa total de cada metabolito (100%) correspondia à soma das integrações normalizadas desse metabolito em P2, P4, P6 e P8. Em cada octante, destacaram-se os metabolitos muito aumentados (↑↑, acima de 35%), aumentados (↑, 30-35%), diminuídos (↓, 15-20%) e muito diminuídos (↓↓, inferior a 15%). **PC**, fosfocolina; **GPC**, glicerofosfocolina.

Tal como se pode observar na Figura 53, entre os metabolitos conhecidos, apenas o fumarato e o *scyllo*-inositol apresentaram uma quantidade relativa < 20% ou > 30% em todos os octantes. Apesar de se ter relatado o seu papel na estabilização de HIFα mesmo em condições normóxicas [250], o nível de fumarato (P8 > P2 > P4 > P6) não apresentou uma relação direta com os níveis de outros metabolitos

que se pensa serem influenciados pelo desencadeamento de uma resposta hipóxica, nomeadamente, PC ($P2 > (P4 \sim P6) > P8$) e adenosina/inosina ($P4 > P2 > (P6 \sim P8)$). Na verdade, não se observaram correlações entre os níveis de nenhuns dos metabolitos presentes na Figura 53, comprovando-se o caráter multifatorial da regulação das vias metabólicas. Ainda assim, relativamente aos restantes octantes, ponderou-se que: **a)** no octante P2, os níveis superiores de glucose e inferiores de formato e acetona podiam estar associados, respetivamente, a uma menor capacidade proliferativa e invasiva [245,246,266]; **b)** o menor teor em glucose observado em P4 podia indicar a sua maior taxa glicolítica, sendo que o aumento dos nucleósidos (hipoxantina e adenosina/inosina) verificado podia resultar da degradação de nucleótidos; **c)** os níveis superiores de formato e acetona no octante P6 podiam traduzir a sua maior capacidade invasiva, por outro lado o menor teor de asparagina podia indicar menor taxa de proliferação [269]; **d)** os níveis aumentados de asparagina no octante P8 podiam promover a sua proliferação. Assim, entre os octantes do tumor P analisados, pensa-se que o P2 foi aquele com características menos agressivas. Tal esteve de acordo com a PCA inicial (Figura 21a) já que apenas o octante P2 do tumor P ficou agrupado com os tumores Q, R e S, que se pensa serem menos agressivos do que o tumor P (subcapítulo 3.2.2.3.).

Por contribuir para um comportamento mais adaptável às condições do microambiente, a elevada heterogeneidade intra-tumoral geralmente relaciona-se com cancros mais agressivos, resistentes a terapias e com maior capacidade metastática [270]. Segundo os dados obtidos na presente tese, o nível relativo de heterogeneidade metabólica intra-tumoral dependeu do tipo de extratos analisados, demonstrando-se a complementaridade entre as análises dos extratos aquosos e lipídicos.

3.4. Análise da expressão das isoformas do recetor de progesterona (PR_A e PR_B)

Considerando que o tumor P apresentou um perfil de metabolitos aquosos e lipídicos diferente dos restantes tumores do tipo 59-2-HI e que este foi o único tumor do ano 2006, poder-se-ia ponderar a eventual troca de amostras com o tipo 59-HI (mais agressivo que o tipo 59-2-HI) ou mesmo a evolução do tumor para uma variante metabolicamente distinta. Em estudos anteriores verificou-se que uma das características diferenciais entre os tipos 59-HI e 59-2-HI era a razão entre as isoformas A e B dos PRs (PR_A/PR_B) [125]. Na Figura 54 apresenta-se o perfil de bandas de *western blot* esperado para os tumores 59-HI, 59-2-HI e C7-2-HI de acordo com a referência [125], verificando-se que: **a)** os tumores 59-HI exibiam bandas com uma intensidade praticamente impercetível; **b)** os tumores 59-2-HI apresentavam uma razão PR_A/PR_B claramente superior aos tipos 59-HI e C7-2-HI; **c)** os tumores C7-2-HI caracterizavam-se por uma razão PR_A/PR_B mais próxima de 1 que os 59-2-HI.

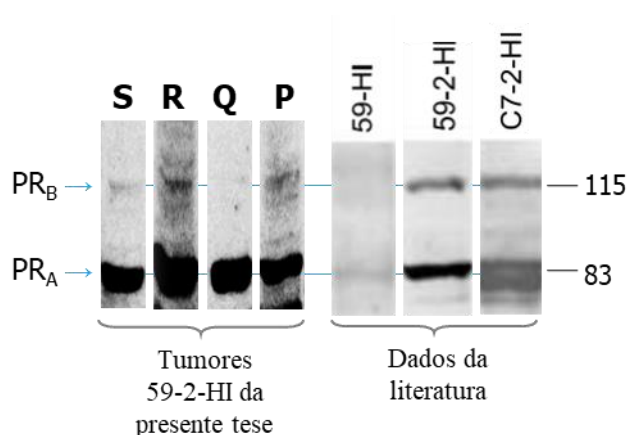


Figura 54 - Western blots da expressão das isoformas A e B do recetor de progesterona (PR) nos tumores 59-2-HI (P, Q, R e S) analisados na presente tese. Como termo de comparação também se apresentam dados representativos dos tipos 59-HI, 59-2-HI e C7-2-HI [125]. Todos os tumores foram induzidos por MPA em murganhos BALB/c.

Na presente tese, os tumores P, Q, R e S apresentaram uma abundância de $PR_A \gg PR_B$, tal como seria esperado de carcinomas do tipo 59-2-HI. Desta forma, pode concluir-se que à semelhança de Q, R e S, também o tumor P pertencia realmente ao tipo 59-2-HI. Não se exclui a possibilidade de que o tumor P tenha evoluído, que existam diferentes subclasses dentro do tipo 59-2-HI ou ainda a influência do maior tempo de armazenamento do tumor P (do ano de 2006) em comparação com os tumores Q, R e S (do ano de 2008). Neste contexto seria interessante realizar análises complementares (*e.g.* histológicas e IHC) nos restantes octantes tumorais armazenados para esse fim.

4. Conclusão e perspectivas futuras

Na presente tese analisou-se o metaboloma de extratos aquosos e lipídicos de tumores mamários induzidos por MPA em murganhos BALB/c. Recorrendo à espectroscopia de RMN de ^1H , aliada a métodos de análise estatística univariada e multivariada, pretendeu-se determinar as principais variações metabólicas entre: **a)** tumores de diferentes tipos (59-2-HI vs. C7-2-HI); **b)** tumores do mesmo tipo; **c)** frações distintas de cada tumor individual.

Relativamente à comparação entre tumores 59-2-HI (P, Q, R e S) e C7-2-HI (T, U e V), observaram-se diversas variações significativas numa larga gama de metabolitos hidrofílicos, notando-se um menor número de alterações no metaboloma lipídico. O facto do tumor P se ter distanciado dos restantes tumores 59-2-HI nas primeiras análises de PCA e PLS-DA entre os diferentes tipos sugeriu que este apresentava um perfil de metabolitos hidrofílicos distinto. Como este tumor era o único tumor do ano de 2006 (sendo os restantes de 2008) as suas diferenças metabólicas podiam não estar relacionadas apenas com as características intrínsecas do tumor, mas sim com fatores externos (como o maior tempo de armazenamento, embora pouco provável que o efeito seja tão vasto como o observado). Assim realizou-se uma segunda análise estatística excluindo o tumor P, o que veio melhorar ligeiramente a distinção entre os tipos de tumores. Relativamente aos tumores C7-2-HI, os tumores 59-2-HI apresentaram níveis significativamente: **a)** mais elevados de vários ácidos orgânicos (piruvato, succinato, citrato e fumarato), compostos de colina (colina e GPC), bases azotadas (uracilo e hipoxantina), nucleósidos (adenosina/inosina) e outros metabolitos (creatina, esfingomielina, etanolamina, glicerol e glutamato), incluindo compostos desconhecidos; **b)** mais baixos de diversos aminoácidos essenciais (Ile, Leu, Val, Thr, Lys, Met e Phe) e não essenciais (Ala, Asn, Gln, Pro, Ser e Tyr), poliálcoois (*myo*- e *scyllo*-inositol) e outros metabolitos (fosfocolina, uridina e acetona), incluindo compostos desconhecidos. Ainda que as propostas de interpretação discutidas na presente tese relativamente a estas diferenças metabólicas necessitem de confirmação posterior, algumas das características metabólicas do tipo C7-2-HI estiveram de acordo com a sua maior capacidade metastática/agressividade (por exemplo, o nível mais elevado de vários aminoácidos, intermediários do ciclo de *Krebs* e acetona em relação ao tipo 59-2-HI).

Seguiu-se a comparação entre os metabolomas polar e lipídico de tumores do mesmo tipo. A análise dos tumores 59-2-HI tornou ainda mais evidente a discrepância entre o perfil médio de metabolitos hidrofílicos e lipofílicos do tumor P em relação aos tumores Q, R e S que, por sua vez, demonstraram grande homogeneidade metabólica entre si. Com base nas alterações metabólicas que o tumor P apresentou (principalmente o nível mais elevado de piruvato, lactato e formato e mais diminuído de taurina), pensa-se que este tumor apresentava um fenótipo mais agressivo e invasivo dentro dos tumores 59-2-HI. Já os tumores C7-2-HI mostraram maior heterogeneidade do que os tumores Q, R e S, tanto no metaboloma polar como no lipídico, o que pode estar relacionado com a maior agressividade que este tipo apresenta.

Por fim, determinou-se o grau relativo de heterogeneidade intra-tumoral com base no RSD (%) das integrações normalizadas de cada metabolito. Averiguou-se que o tumor P era o mais heterogéneo em termos de metabolitos hidrofílicos, mas o mais homogéneo em termos de metabolitos lipofílicos. Verificou-se também que, em relação aos tumores Q, R e S, os tumores C7-2-HI exibiram um maior número de metabolitos com uma variabilidade intra-tumoral elevada (*e.g.* adenosina/inosina e fumarato), o que vai ao encontro da sua maior capacidade metastática. Observou-se ainda que, enquanto que alguns metabolitos variaram de forma acentuada em todos os tumores independentemente do seu tipo, outros fizeram-no apenas num dos tipos ou em tumores específicos.

Em suma, como era esperado, a heterogeneidade metabólica observada entre os tumores C7-2-HI e 59-2-HI foi a mais prevalente do que as diferenças observadas entre tumores do mesmo tipo e a um nível intra-tumoral, sendo que estas últimas também se verificaram e foram significativas. Tendo em conta a heterogeneidade e o perfil metabólico que exibiram, os tumores mamários analisados na presente tese pareceram representar de forma razoável o BCa humano.

Como perspetivas futuras pretende-se completar este estudo no sentido de validar estatisticamente os modelos estatísticos obtidos, determinar a estabilidade metabólica das amostras a diferentes temperaturas e recorrer aos espectros 2D obtidos, não só para confirmar a identificação de sinais proposta, mas também para tentar identificar os metabolitos desconhecidos. Por outro lado, de modo a comprovar a interpretação metabólica, seria interessante investigar um maior número de tumores do mesmo modelo animal, aliar os resultados desta tese a outros estudos *ómicos* (como proteómica ou genómica), realizar estudos mais dirigidos para vias específicas (por exemplo, através do estudo IHC de enzimas/transportadores que pudessem promover as alterações metabólicas observadas) e ainda explorar as características do microambiente tumoral (por exemplo, determinar o grau de vascularização/hipóxia dos tumores analisados).

5. Bibliografia

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49: 1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
2. The World Health Organization. Breast Cancer [Internet]. [cited 22 Nov 2017]. Available: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
3. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition-summary document. *Ann Oncol*. 2008;19: 614–622. doi:10.1093/annonc/mdm481
4. WHO. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018 [Internet]. 2018 [cited 5 Oct 2018]. Available: <https://gco.iarc.fr/today/home>
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144: 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
6. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117: 3155–3163. doi:10.1172/JCI33295
7. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, Hartman AR, Winer EP, Garber JE. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34: 1460–1468. doi:10.1200/JCO.2015.65.0747
8. Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrri A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015;41: 1–8. doi:10.1016/j.ctrv.2014.10.008
9. OECD/EU. Health at a Glance: Europe 2016 – State of Health in the EU Cycle. OECD Publishing. Paris; 2016. doi:10.1787/9789264265592-en
10. Anderson E. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002;4: 197–201. doi:10.1186/bcr452
11. Ditttrich A, Gautrey H, Browell D, Tyson-Capper A. The HER2 signaling network in Breast Cancer—Like a spider in its web. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014;19: 253–270. doi:10.1007/s10911-014-9329-5
12. Radin DP, Patel P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur J Pharmacol*. 2016;781: 173–180. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.017
13. Liu R, Shi P, Nie Z, Liang H, Zhou Z, Chen W, Chen H, Dong C, Yang R, Liu S, Chen C. Mifepristone suppresses basal triple-negative breast cancer stem cells by down-regulating KLF5 expression. *Theranostics*. 2016;6: 533–544. doi:10.7150/thno.14315
14. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1987;51: 941–951. doi:10.1016/0092-8674(87)90581-2
15. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2017;16: 4–20. doi:10.1002/rmb2.12006
16. Márquez DC, Lee J, Lin T, Pietras RJ. Epidermal Growth Factor Receptor and Tyrosine Phosphorylation of Estrogen Receptor. *Endocrine*. 2001;16: 73–81. doi:10.1385/ENDO:16:2:073
17. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*. 2002;2: 101–112. doi:10.1038/nrc721
18. Yamaga R, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Suzuki Y, Inoue S. RNA Sequencing of MCF-7 Breast Cancer Cells Identifies Novel Estrogen-Responsive Genes with Functional Estrogen Receptor-Binding Sites in the Vicinity of Their Transcription Start Sites. *Horm Cancer*. 2013;4: 222–232. doi:10.1007/s12672-013-0140-3
19. Badowska-Kozakiewicz AM, Patera J, Sobol M, Przybylski J. The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer – immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. *Contemp Oncol*. 2015;19: 220–225. doi:10.5114/wo.2015.51826
20. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol*. 2016;428: 3831–3849. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.020

21. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, Serandour AAA, Birrell SN, Bruna A, Saadi A, Menon S, Hadfield J, Pugh M, Raj G V., Brown GD, D'Santos C, Robinson JLL, ... Carroll JS. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*. 2015;523: 313–317. doi:10.1038/nature14583
22. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* (80-). 1995;270: 1491–1494. doi:10.1126/science.270.5241.1491
23. Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Estrogen Receptor α -Positive Breast Cancer Cells In vitro Induces an In vivo Molecular Phenotype of Estrogen Receptor α -Negative Human Breast Tumors. *Cancer Res*. 2006;66: 3903–3911. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4363
24. Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ER α expression in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2001;15: 1344–1359. doi:10.1210/mend.15.8.0678
25. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11: 85–95. doi:10.1038/nrc2981
26. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: A review. *Clin Cancer Res*. 2009;15: 431–440. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1059
27. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80-). 2009;324: 1029–1033. doi:10.1126/science.1160809
28. Hirschhaeuser F, Sattler UGA, Mueller-Klieser W. Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Res*. 2011;71: 6921–6925. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457
29. Lukey MJ, Katt WP, Cerione RA. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2017;22: 796–804. doi:10.1016/j.drudis.2016.12.003
30. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010;35: 427–433. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.003
31. Chen T, Li H. Fatty acid metabolism and prospects for targeted therapy of cancer. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2017;119: 1600366. doi:10.1002/ejlt.201600366
32. Yeh C-C, Hou M-F, Wu S-H, Tsai S-M, Lin S-K, Hou LA, Ma H, Tsai L-Y. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct*. 2006;24: 555–559. doi:10.1002/cbf.1275
33. Deberardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med*. 2008;10: 767–777. doi:10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b
34. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group; 2015;12: 381–394. doi:10.1038/nrclinonc.2015.73
35. Kim IS, Zhang XHF. One microenvironment does not fit all: heterogeneity beyond cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35: 601–629. doi:10.1007/s10555-016-9643-z
36. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013;183: 1113–1124. doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.002
37. Skibinski A, Kuperwasser C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*. 2015;34: 5309–5316. doi:10.1038/onc.2014.475
38. F.A. T, P. D, (Eds.). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003.
39. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10: 955–960. doi:10.4161/cbt.10.10.13879
40. Ward EM, DeSantis CE, Lin CC, Kramer JL, Jemal A, Kohler B, Brawley OW, Gansler T. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *CA Cancer J Clin*. 2015;65: 481–495. doi:10.3322/caac.21321
41. Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CK, Hicks J, King TA, Reis-Filho JS. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol Oncol*. 2013;7: 859–869. doi:10.1016/j.molonc.2013.07.005

42. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992;20: 479–489. doi:10.1111/j.1365-2559.1992.tb01032.x
43. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93: 1046–1052. doi:10.1038/sj.bjc.6602787
44. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau S-W, Broglio K, Theriault RL, Valero V, Buzdar AU, Kuerer H, Buccholz TA, Hortobagyi GN. Invasive Lobular Carcinoma Classic Type: Response to Primary Chemotherapy and Survival Outcomes. *J Clin Oncol*. 2005;23: 41–48. doi:10.1200/JCO.2005.03.111
45. Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19: 403–410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
46. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, Mcshane L, Miller K, Osborne CK, ... Wolff AC. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134: e48–e72. doi:10.1043/1543-2165-134.7.e48
47. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez E a, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, ... Hayes DF. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131: 18–43. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2
48. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 2009;15: 593–602. doi:10.1111/j.1524-4741.2009.00822.x
49. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26: v8–v30. doi:10.1093/annonc/mdv298
50. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, Davidson NE. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res*. 1996;2: 805–810.
51. Yeung C, Hilton J, Clemons M, Mazzarello S, Hutton B, Haggar F, Addison CL, Kuchuk I, Zhu X, Gelmon K, Arnaout A. Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours—a review. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35: 427–437. doi:10.1007/s10555-016-9631-3
52. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees C a, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen L a, Fluge O, Pergamenschikov a, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale a L, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406: 747–752. doi:10.1038/35021093
53. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale A-L, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 8418–8423. doi:10.1073/pnas.0932692100
54. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38: 698–707. doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.005
55. Dvorkin-Gheva A, Hassell JA. Identification of a novel luminal molecular subtype of breast cancer. *PLoS One*. 2014;9: e103514. doi:10.1371/journal.pone.0103514
56. Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Chabannon C, Charpin C, Chaffanet M, Jacquemier J, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F. Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer Res*. 2008;68: 767–776. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5516

57. Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schott S, Marmé F, Varga Z, Lebeau A, Kreipe H, Schneeweiss A. Multigene assays for classification, prognosis, and prediction in breast cancer: A critical review on the background and clinical utility. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;73: 932–940. doi:10.1055/s-0033-1350831
58. Prosigna. The Prosigna™ Breast Cancer Prognostic Gene Signature. CE Prod Summ Sheet. 2013;
59. Prat A, Parker JS, Fan C, Perou CM. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135: 301–306. doi:10.1007/s10549-012-2143-0
60. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, ... Bernard PS. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27: 1160–1167. doi:10.1200/JCO.2008.18.1370
61. World Health Organization. Breast cancer: prevention and control [Internet]. [cited 22 Nov 2017]. Available: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>
62. Jackisch C, Harbeck N, Huober J, Von Minckwitz G, Gerber B, Kreipe HH, Liedtke C, Marschner N, Möbus V, Scheithauer H, Schneeweiss A, Thomssen C, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, ... Untch M. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, Controversies, Consensus - Primary Therapy of Early Breast Cancer: Opinions Expressed by German Experts. *Breast Care.* 2015;10: 211–219. doi:10.1159/000433590
63. Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Res.* 2010;12: S5. doi:10.1186/bcr2734
64. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, Anders C, Ewend M, Perou CM. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132: 523–535. doi:10.1007/s10549-011-1619-7
65. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101: 736–750. doi:10.1093/jnci/djp082
66. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, Van De Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 5367–5374. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
67. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22: 1736–1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
68. Kümler I, Knoop AS, Jessing CAR, Ejlersen B, Nielsen DL. Review of hormone-based treatments in postmenopausal patients with advanced breast cancer focusing on aromatase inhibitors and fulvestrant. *ESMO Open.* 2016;1: e000062. doi:10.1136/esmoopen-2016-000062
69. Morigi C. Highlights from the 15th St Gallen International Breast Cancer Conference 15-18 March, 2017, Vienna: tailored treatments for patients with early breast cancer. *Ecancermedalscience.* 2017;11: 732. doi:10.3332/ecancer.2017.732
70. Chen J-Y, Kuo S-J, Liaw Y-P, Avital I, Stojadinovic A, Man Y-G, Mannion C, Wang J, Chou M-C, Tsai H-D, Chen S-T, Hsiao Y-H. Endometrial cancer incidence in breast cancer patients correlating with age and duration of tamoxifen use: a population based study. *J Cancer.* 2014;5: 151–155. doi:10.7150/jca.8412
71. Parikh RP, Odom EB, Yu L, Colditz GA, Mykietyn TM. Complications and thromboembolic events associated with tamoxifen therapy in patients with breast cancer undergoing microvascular breast reconstruction: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;163: 1–10. doi:10.1007/s10549-017-4146-3
72. Maximov PY, McDaniel RE, Fernandes DJ, Korostyshevskiy VR, Bhatta P, Mürdter TE, Flockhart DA, Jordan VC. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *Br J Pharmacol.* 2014;171: 5624–5635. doi:10.1111/bph.12864
73. Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman R V., Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC.

- Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;85: 151–159. doi:10.1023/B:BREA.0000025406.31193.e8
74. Lim YC, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318: 503–512. doi:10.1124/jpet.105.100511
 75. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31: 203–209. doi:10.1200/JCO.2012.43.4134
 76. Park C, Park K, Kim J, Sin Y, Park I, Cho H, Yang K, Bae BN, Kim KW, Ahn S, Gwak G. Prognostic values of negative estrogen or progesterone receptor expression in patients with luminal B HER2-negative breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2016;14: 244. doi:10.1186/s12957-016-0999-x
 77. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365: 1687–1717. doi:10.1016/S0140-6736(05)66544-0
 78. Teymourzadeh A, Mansouri S, Farahmand L, Hosseinzade A, Majidzadeh-A K. ER- α 36 Interactions With Cytosolic Molecular Network in Acquired Tamoxifen Resistance. *Clin Breast Cancer.* 2017;17: 403–407. doi:10.1016/j.clbc.2017.03.013
 79. Alluri PG, Speers C, Chinnaiyan AM. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2014;16: 494. doi:10.1186/s13058-014-0494-7
 80. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Annu Rev Med.* 2011;62: 233–247. doi:10.1146/annurev-med-070909-182917
 81. Hayes EL, Lewis-Wambi JS. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Res.* 2015;17: 40. doi:10.1186/s13058-015-0542-y
 82. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul).* 2012;20: 256–267. doi:10.4062/biomolther.2012.20.3.256
 83. Fan P, Agboke FA, Cunliffe HE, Ramos P, Jordan VC. A molecular model for the mechanism of acquired tamoxifen resistance in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2014;50: 2866–2876. doi:10.1016/j.ejca.2014.08.011
 84. Ulmann A, Teutsch G, Philibert D. RU 486. *Sci Am.* 1990;262: 42–48. doi:10.1038/scientificamerican0690-42
 85. Cadepond F, Ulmann A, Baulieu E-E. RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of Action and Clinical Uses. *Annu Rev Med.* 1997;48: 129–156. doi:10.1146/annurev.med.48.1.129
 86. Klijn JGM, Jong FH de, Bakker GH, Lamberts SWJ, Rodenburg CJ, Alexieva-Figusc J. Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Res.* 1989;49: 2851–2856.
 87. Bardon S, Vigkpn F, Chalbos D, Rochefort H. RU486, A Progestin and Glucocorticoid Antagonist, Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells via the Progesterone Receptor*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60: 692–697. doi:10.1210/jcem-60-4-692
 88. Wargon V, Helguero LA, Bolado J, Rojas P, Novaro V, Molinolo A, Lanari C. Reversal of antiprogesterin resistance and progesterone receptor isoform ratio in acquired resistant mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116: 449–460. doi:10.1007/s10549-008-0150-y
 89. Rojas PA, May M, Sequeira GR, Elia A, Alvarez M, Martínez P, Gonzalez P, Hewitt S, He X, Perou CM, Molinolo A, Gibbons L, Abba MC, Gass H, Lanari C. Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogesterin Responsiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109: djw317. doi:10.1093/jnci/djw317
 90. Edwards DP, Altmann M, DeMarzo A, Zhang Y, Weigel NL, Beck CA. Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;53: 449–458. doi:10.1016/0960-0760(95)00091-D
 91. Bagchi MK, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW. Identification of a functional intermediate in receptor activation in progesterone-dependent cell-free transcription. *Nature.* 1990;345: 547–550. doi:10.1038/345547a0
 92. Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: Mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update.* 2005;11:

- 293–307. doi:10.1093/humupd/dmi002
93. Wardell SE, Edwards DP. Mechanisms controlling agonist and antagonist potential of selective progesterone receptor modulators (SPRMs). *Semin Reprod Med.* 2005;23: 9–21. doi:10.1055/s-2005-864030
 94. Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL, McDonnell DP. The Nuclear Corepressors NCoR and SMRT Are Key Regulators of Both Ligand- and 8-Bromo-Cyclic AMP-Dependent Transcriptional Activity of the Human Progesterone Receptor. *Mol Cell Biol.* 1998;18: 1369–1378. doi:10.1128/MCB.18.3.1369
 95. Wardell SE, Narayanan R, Weigel NL, Edwards DP. Partial agonist activity of the progesterone receptor antagonist RU486 mediated by an amino-terminal domain coactivator and phosphorylation of serine400. *Mol Endocrinol.* 2010;24: 335–345. doi:10.1210/me.2008-0081
 96. Tieszen CR, Goyeneche AA, Brandhagen BN, Ortahn CT, Telleria CM. Antiprogesterin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer.* 2011;11: 207. doi:10.1186/1471-2407-11-207
 97. Gaddy VT, Barrett JT, Delk JN, Kallab AM, Porter AG, Schoenlein P V. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 5215–5225. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0637
 98. Bardon S, Vignon F, Montcourrier P, Rochefort H. Steroid Receptor-mediated Cytotoxicity of an Antiestrogen and an Antiprogesterin in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 1987;47: 1441–1448.
 99. Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, Polo ML, Gorostiaga MA, Jacobsen B, Molinolo A, Novaro V, Lanari C. Progestin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer.* 2015;136: 2680–2692. doi:10.1002/ijc.29304
 100. Klijn JG, Setyono-Han B, Foekens JA. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids.* 2000;65: 825–830. doi:10.1016/S0039-128X(00)00195-1
 101. National Cancer Institute. Nab-Paclitaxel with or without Mifepristone in Treating Patients with Glucocorticoid Receptor Positive Stage IV or Stage III Triple-Negative Breast Cancer That Cannot Be Removed by Surgery [Internet]. [cited 28 Dec 2017]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/v?id=NCI-2016-01838&r=1>
 102. US National Library of Medicine. Study of Pembrolizumab and Mifepristone in Patients With Advanced HER2-negative Breast Cancer [Internet]. 2017 [cited 28 Dec 2017]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03225547>
 103. Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest.* 2011;121: 3810–3818. doi:10.1172/JCI57088
 104. Sun X, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36: 1219–1227. doi:10.1038/aps.2015.92
 105. Allott EH, Geradts J, Sun X, Cohen SM, Zirpoli GR, Khoury T, Bshara W, Chen M, Sherman ME, Palmer JR, Ambrosone CB, Olshan AF, Troester MA. Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res.* 2016;18: 68. doi:10.1186/s13058-016-0725-1
 106. Tramm T, Kyndi M, Sørensen FB, Overgaard J, Alsner J. Influence of intra-tumoral heterogeneity on the evaluation of BCL2, E-cadherin, EGFR, EMMPRIN, and Ki-67 expression in tissue microarrays from breast cancer. *Acta Oncol (Madr).* 2018;57: 102–106. doi:10.1080/0284186X.2017.1404128
 107. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 2014;87: 150–161. doi:10.1016/j.bcp.2013.06.020
 108. Manning HC, Buck JR, Cook RS. Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine. *J Nucl Med.* 2016;57: 60S–68S. doi:10.2967/jnumed.115.157917
 109. Holen I, Speirs V, Morrissey B, Blyth K. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Dis Model Mech.* 2017;10: 359–371. doi:10.1242/dmm.028274
 110. Band V, Mirza S, Mohibi S, Band H. Mouse models of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Carcinog.* 2011;10: 35. doi:10.4103/1477-3163.91116

111. Kafkasli A, Unlenen E, Demirhan B, Yologlu S. Distribution of tamoxifen in rat tissues during steady-state treatment. *Turkish J Med Sci*. 1998;28: 591–594.
112. Klein A, Wessel R, Graessmann M, Jürgens M, Petersen I, Schmutzler R, Niederacher D, Arnold N, Meindl A, Scherneck S, Seitz S, Graessmann A. Comparison of gene expression data from human and mouse breast cancers: Identification of a conserved breast tumor gene set. *Int J Cancer*. 2007;121: 683–688. doi:10.1002/ijc.22630
113. Holstege H, van Beers E, Velds A, Liu X, Joosse S a, Klarenbeek S, Schut E, Kerkhoven R, Klijn CN, Wessels LF, Nederlof PM, Jonkers J. Cross-species comparison of aCGH data from mouse and human BRCA1- and BRCA2-mutated breast cancers. *BMC Cancer*. 2010;10: 455. doi:10.1186/1471-2407-10-455
114. Xia T-S, Wang J, Yin H, Ding Q, Zhang Y-F, Yang H-W, Liu X-A, Dong M, Du Q, Ling L-J, Zha X-M, Fu W, Wang S. Human tissue-specific microenvironment: An essential requirement for mouse models of breast cancer. *Oncol Rep*. 2010;24: 203–211. doi:10.3892/or_00000847
115. Morton JJ, Bird G, Keysar SB, Astling DP, Lyons TR, Anderson RT, Glogowska MJ, Estes P, Eagles JR, Le PN, Gan G, McGettigan B, Fernandez P, Padilla-Just N, Varella-Garcia M, Song JJ, Bowles DW, ... Jimeno A. XactMice: Humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer. *Oncogene*. 2016;35: 290–300. doi:10.1038/onc.2015.94
116. Zheng M-J, Wang J, Xu L, Zha X-M, Zhao Y, Ling L-J, Wang S. Human mammary microenvironment better regulates the biology of human breast cancer in humanized mouse model. *Med Oncol*. 2015;32: 8. doi:10.1007/s12032-014-0427-4
117. Fleming JM, Miller TC, Kidacki M, Ginsburg E, Stuelten CH, Stewart DA, Troester MA, Vonderhaar BK. Paracrine interactions between primary human macrophages and human fibroblasts enhance murine mammary gland humanization in vivo. *Breast Cancer Res*. 2012;14: R97. doi:10.1186/bcr3215
118. Hoenerhoff MJ, Michalowski AM, Qiu T-H, Green JE. Bioinformatics Approaches to the Analysis of the Transcriptome of Animal Models of Cancer. In: Gordon GJ, editor. *Bioinformatics in Cancer and Cancer Therapy*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. pp. 55–76. doi:10.1007/978-1-59745-576-3_4
119. Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC, Giulianelli S, Cerliani JP, Wargon V, Molinolo A. The MPA mouse breast cancer model: Evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16: 333–350. doi:10.1677/ERC-08-0244
120. Giulianelli S, Vaqué JP, Soldati R, Wargon V, Vanzulli SI, Martins R, Zeitlin E, Molinolo AA, Helguero LA, Lamb CA, Gutkind JS, Lanari C. Estrogen receptor alpha mediates progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer Res*. 2012;72: 2416–2427. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3290
121. Riggio M, Polo ML, Blaustein M, Colman-lerner A, Lüthy I, Lanari C, Novaro V. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33: 509–518. doi:10.1093/carcin/bgr303
122. Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA, Luthy IA, Pazos P, Charreau E, Vanzulli S, Lanari C. Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;68: 11–21. doi:10.1016/S0960-0760(98)00166-6
123. Polo ML, Riggio M, May M, Rodríguez MJ, Perrone MC, Stallings-Mann M, Kaen D, Frost M, Goetz M, Boughey J, Lanari C, Radisky D, Novaro V. Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling in the tumor stroma drives endocrine therapy-dependent breast tumor regression. *Oncotarget*. 2015;6: 22081–22097. doi:10.18632/oncotarget.4203
124. Giulianelli S, Herschkowitz JI, Patel V, Lamb CA, Gutkind JS, Molinolo A, Perou CM, Lanari C. MPA-induced gene expression and stromal and parenchymal gene expression profiles in luminal murine mammary carcinomas with different hormonal requirements. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129: 49–67. doi:10.1007/s10549-010-1185-4
125. Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C, Molinolo AA. Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;79: 379–390. doi:10.1023/A:1024029826248
126. Vanzulli S, Efeyan A, Benavides F, Helguero LA, Peters G, Shen J, Conti CJ, Lanari C, Molinolo A. p21, p27 and p53 in estrogen and antiprogesterin-induced tumor regression of experimental mouse mammary

- ductal carcinomas. *Carcinogenesis*. 2002;23: 749–758. doi:10.1093/carcin/23.5.749
127. Kalita-de Croft P, Al-Ejeh F, McCart Reed AE, Saunus JM, Lakhani SR. 'Omics Approaches in Breast Cancer Research and Clinical Practice. *Adv Anat Pathol*. 2016;23: 356–367. doi:10.1097/PAP.0000000000000128
 128. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, Fulton LL, Dooling DJ, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Ally A, Balasundaram M, Butterfield YSN, Carlsen R, Carter C, Chu A, ... Palchik JD. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490: 61–70. doi:10.1038/nature11412
 129. Haukaas TH, Euceda LR, Giskeødegård GF, Lamichhane S, Krohn M, Jernström S, Aure MR, Lingjærde OC, Schlichting E, Garred Ø, Due EU, Mills GB, Sahlberg KK, Børresen-Dale A-L, Bathen TF. Metabolic clusters of breast cancer in relation to gene- and protein expression subtypes. *Cancer Metab*. 2016;4: 12. doi:10.1186/s40170-016-0152-x
 130. Sijens PE, Wijrdeman HK, Moerland MA, Bakker CJ, Vermeulen JW, Luyten PR. Human breast cancer in vivo: H-1 and P-31 MR spectroscopy at 1.5 T. *Radiology*. 1988;169: 615–620. doi:10.1148/radiology.169.3.2847230
 131. Zhou J, Wang Y, Zhang X. Metabonomics studies on serum and urine of patients with breast cancer using 1H-NMR spectroscopy. *Oncotarget*. 2017;5: 1–9.
 132. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res*. 2003;5: 89–95. doi:10.1186/bcr577
 133. Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. Catabolic cancer-associated fibroblasts (CAFs) transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol*. 2014;25: 47–60. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.005
 134. Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*. 2013;9: 1048–1072. doi:10.1007/s11306-013-0524-y
 135. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy [Internet]. 4th ed. Brooks/Cole, CENGAGE Learning; 2009. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570677X12000743>
 136. Okuda T, Hirakawa K, Orbay H, Ohno Y, Hyakusoku H. Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a useful tool for ingredient analysis of synthetic materials. *Plast Reconstr Surg*. 2012. p. 197e–198e. doi:10.1097/PRS.0b013e3182365d00
 137. Jagannathan N, Sharma U. Breast Tissue Metabolism by Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolites*. 2017;7: 25. doi:10.3390/metabo7020025
 138. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6: 469–479. doi:10.1021/pr060594q
 139. Saccenti E, Hoefsloot HCJ, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MMWB. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 2014;10: 361–374. doi:10.1007/s11306-013-0598-6
 140. Berben L, Sereika SM, Engberg S. Effect size estimation: Methods and examples. *Int J Nurs Stud*. 2012;49: 1039–1047. doi:10.1016/j.ijnurstu.2012.01.015
 141. Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjösne HE, Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed*. 2002;15: 327–337. doi:10.1002/nbm.775
 142. Sharma U, Mehta A, Seenu V, Jagannathan NR. Biochemical characterization of metastatic lymph nodes of breast cancer patients by in vitro 1H magnetic resonance spectroscopy: A pilot study. *Magn Reson Imaging*. 2004;22: 697–706. doi:10.1016/j.mri.2004.01.037
 143. Maria RM, Altei WF, Andricopulo AD, Becceneri AB, Cominetti MR, Venâncio T, Colnago LA. Characterization of metabolic profile of intact non-tumor and tumor breast cells by high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem*. 2015;488: 14–18. doi:10.1016/j.ab.2015.07.015
 144. Merchant TE, Gierke LW, Meneses P, Glonek T. 31P Magnetic Resonance Spectroscopic Profiles of Neoplastic Human Breast Tissues. *Cancer Res*. 1988;48: 5112–5118.
 145. Smith TAD, Glaholm J, Leach MO, Machin L, Collins DJ, Payne GS, Mccready VR. A comparison of in

- vivo and in vitro ³¹P NMR spectra from human breast tumours : Variations in phospholipid metabolism. *Br J Cancer*. 1991;63: 514–516. doi:10.1038/bjc.1991.122
146. Gribbestad IS, Petersen SB, Fjøsne HE, Kvinnsland S, Krane J. ¹H NMR spectroscopic characterization of perchloric acid extracts from breast carcinomas and non-involved breast tissue. *NMR Biomed*. 1994;7: 181–194. doi:10.1002/nbm.1940070405
 147. Zhao YH, Zhou M, Liu H, Ding Y, Khong HT, Yu D, Fodstad O, Tan M. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene*. 2009;28: 3689–3701. doi:10.1038/onc.2009.229
 148. Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, Brys M. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res*. 2012;18: 721–728. doi:10.1007/s12253-012-9500-5
 149. Chaneton B, Gottlieb E. Rocking cell metabolism: Revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2012;37: 309–316. doi:10.1016/j.tibs.2012.04.003
 150. Cheng LL, Chang IW, Smith BL, Gonzalez RG. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson*. 1998;135: 194–202. doi:10.1006/jmre.1998.1578
 151. Sitter B, Lundgren S, Bathen TF, Halgunset J, Fjøsne HE, Gribbestad IS. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed*. 2006;19: 30–40. doi:10.1002/nbm.992
 152. Glunde K, Jie C, Bhujwalla ZM. Molecular Causes of the Aberrant Choline Phospholipid Metabolism in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2004;64: 4270–4276. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3829
 153. Park VY, Yoon D, Koo JS, Kim E-K, Kim S II, Choi JS, Park S, Park HS, Kim S, Kim MJ. Intratumoral Agreement of High-Resolution Magic Angle Spinning Magnetic Resonance Spectroscopic Profiles in the Metabolic Characterization of Breast Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95: e3398. doi:10.1097/MD.0000000000003398
 154. Budczies J, Denkert C, Müller BM, Brockmöller SF, Klauschen F, Györfy B, Dietel M, Richter-Ehrenstein C, Marten U, Salek RM, Griffin JL, Hilvo M, Orešič M, Wohlgemuth G, Fiehn O. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue - a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics*. 2012;13: 334. doi:10.1186/1471-2164-13-334
 155. Mountford CE, Somorjai RL, Malycha P, Gluch L, Lean C, Russell P, Barraclough B, Gillett D, Himmelreich U, Dolenko B, Nikulin AE, Smith ICP. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine-needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br J Surg*. 2001;88: 1234–1240. doi:10.1046/j.0007-1323.2001.01864.x
 156. Baltzer PAT, Dietzel M. Breast Lesions: Diagnosis by Using Proton MR Spectroscopy at 1.5 and 3.0 T—Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology*. 2013;267: 735–746. doi:10.1148/radiol.13121856
 157. Kvistad K a, Bakken IJ, Gribbestad IS, Ehrnholm B, Lundgren S, Fjøsne HE, Haraldseth O. Characterization of neoplastic and normal human breast tissues with in vivo ¹H MR spectroscopy. *J Magn Reson Imaging*. 1999;10: 159–164. doi:10.1002/(SICI)1522-2586(199908)10:2<159::AID-JMRI8>3.0.CO;2-0
 158. Beckonert O, Monnerjahn J, Bonk U, Leibfritz D. Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ¹H-NMR spectroscopy and self-organizing maps. *NMR Biomed*. 2003;16: 1–11. doi:10.1002/nbm.797
 159. Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjøsne HE, Halgunset J, Axelsson DE, Gribbestad IS, Lundgren S. MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;104: 181–189. doi:10.1007/s10549-006-9400-z
 160. Chae EY, Shin HJ, Kim S, Baek HM, Yoon D, Kim S, Shim YE, Kim HH, Cha JH, Choi WJ, Lee JH, Shin JH, Lee HJ, Gong G. The role of high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy for predicting the invasive component in patients with ductal carcinoma in situ diagnosed on preoperative biopsy. *PLoS One*. 2016;11: e0161038. doi:10.1371/journal.pone.0161038
 161. Cao MD, Lamichhane S, Lundgren S, Bofin A, Fjøsne H, Giskeødegård GF, Bathen TF. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2014;14: 941. doi:10.1186/1471-2407-14-941
 162. Tang X, Lin C, Spasojevic I, Iversen ES, Chi J, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics

- of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16: 415. doi:10.1186/s13058-014-0415-9
163. Brockmøller SF, Bucher E, Müller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, Orešič M, Kallioniemi O, Iljin K, Loibl S, Darb-Esfahani S, Sinn B V., Klauschen F, Prinzler J, Bangemann N, Ismaeel F, Fiehn O, Denkert C. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J Proteome Res.* 2012;11: 850–860. doi:10.1021/pr200685r
 164. Cao MD, Döpkens M, Krishnamachary B, Vesuna F, Gadiya MM, Lønning PE, Bhujwalla ZM, Gribbestad IS, Glunde K. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR Biomed.* 2012;25: 1033–1042. doi:10.1002/nbm.2766
 165. Giskeødegård GF, Grinde MT, Sitter B, Axelson DE, Lundgren S, Fjøsne HE, Dahl S, Gribbestad IS, Bathen TF. Multivariate Modeling and Prediction of Breast Cancer Prognostic Factors Using MR Metabolomics. *J Proteome Res.* 2010;9: 972–979. doi:10.1021/pr9008783
 166. Liu S, Chia SK, Mehl E, Leung S, Rajput A, Cheang MCU, Nielsen TO. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119: 53–61. doi:10.1007/s10549-009-0318-0
 167. Borgan E, Sitter B, Lingjaerde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, Sorlie T, Borresen-Dale AL, Gribbestad IS. Merging transcriptomics and metabolomics--advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer.* 2010;10: 628. doi:10.1186/1471-2407-10-628
 168. Cao MD, Giskeødegård GF, Bathen TF, Sitter B, Bofin A, Lønning PE, Lundgren S, Gribbestad IS. Prognostic value of metabolic response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer.* 2012;12: 39. doi:10.1186/1471-2407-12-39
 169. Choi JS, Baek H-M, Kim S, Kim MJ, Youk JH, Moon HJ, Kim E-K, Nam YK. Magnetic Resonance Metabolic Profiling of Breast Cancer Tissue Obtained with Core Needle Biopsy for Predicting Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *PLoS One.* 2013;8: e83866. doi:10.1371/journal.pone.0083866
 170. Cao MD, Sitter B, Bathen TF, Bofin A, Lønning PE, Lundgren S, Gribbestad IS. Predicting long-term survival and treatment response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy by MR metabolic profiling. *NMR Biomed.* 2012;25: 369–378. doi:10.1002/nbm.1762
 171. Euceda LR, Haukaas TH, Giskeødegård GF, Vettukattil R, Engel J, Silwal-Pandit L, Lundgren S, Borgen E, Garred Ø, Postma G, Buydens LMC, Børresen-Dale A-L, Engebraaten O, Bathen TF. Evaluation of metabolomic changes during neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab in breast cancer using MR spectroscopy. *Metabolomics.* 2017;13: 37. doi:10.1007/s11306-017-1168-0
 172. Gogiashvili M, Horsch S, Marchan R, Gianmoena K, Cadenas C, Tanner B, Naumann S, Ersova D, Lippek F, Rahnenführer J, Andersson JT, Hergenröder R, Lambert J, Hengstler JG, Edlund K. Impact of intratumoral heterogeneity of breast cancer tissue on quantitative metabolomics using high-resolution magic angle spinning 1 H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 2018;31: e3862. doi:10.1002/nbm.3862
 173. Moestue SA, Borgan E, Huuse EM, Lindholm EM, Sitter B, Børresen-Dale A-L, Engebraaten O, Mælandsmo GM, Gribbestad IS. Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models. *BMC Cancer.* 2010;10: 433. doi:10.1186/1471-2407-10-433
 174. Grinde MT, Moestue SA, Borgan E, Risa Ø, Engebraaten O, Gribbestad IS. ¹³C High-resolution-magic angle spinning MRS reveals differences in glucose metabolism between two breast cancer xenograft models with different gene expression patterns. *NMR Biomed.* 2011;24: 1243–1252. doi:10.1002/nbm.1683
 175. Seierstad T, Røe K, Sitter B, Halgunset J, Flatmark K, Ree AH, Olsen D, Gribbestad IS, Bathen TF. Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human rectal cancer biopsies and colorectal xenografts using high-resolution magic angle spinning 1H magnetic resonance spectroscopy. *Mol Cancer.* 2008;7: 33. doi:10.1186/1476-4598-7-33
 176. Morse DL, Raghunand N, Sadarangani P, Murthi S, Job C, Day S, Howison C, Gillies RJ. Response of choline metabolites to docetaxel therapy is quantified in vivo by localized 31P MRS of human breast cancer xenografts and in vitro by high-resolution 31P NMR spectroscopy of cell extracts. *Magn Reson Med.* 2007;58: 270–280. doi:10.1002/mrm.21333
 177. Jensen LR, Huuse EM, Bathen TF, Goa PE, Bofin AM, Pedersen TB, Lundgren S, Gribbestad IS.

- Assessment of early docetaxel response in an experimental model of human breast cancer using DCE-MRI, ex vivo HR MAS, and in vivo 1H MRS. *NMR Biomed.* 2010;23: 56–65. doi:10.1002/nbm.1426
178. van Asten JJ, Vettukattil R, Buckle T, Rottenberg S, van Leeuwen F, Bathen TF, Heerschap A. Increased levels of choline metabolites are an early marker of docetaxel treatment response in BRCA1-mutated mouse mammary tumors: an assessment by ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *J Transl Med.* 2015;13: 114. doi:10.1186/s12967-015-0458-4
 179. Borgan E, Lindholm EM, Moestue S, Mælandsmo GM, Lingjærde OC, Gribbestad IS, Børresen-Dale AL, Engebraaten O, Sørli T. Subtype-specific response to bevacizumab is reflected in the metabolome and transcriptome of breast cancer xenografts. *Mol Oncol.* 2013;7: 130–142. doi:10.1016/j.molonc.2012.10.005
 180. Long J-P, Li X-N, Zhang F. Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? *World J Clin Oncol.* 2016;7: 122–130. doi:10.5306/wjco.v7.i1.122
 181. National Cancer Institute. FDA Approval for Everolimus [Internet]. 2013 [cited 15 Dec 2017]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus>
 182. Euceda LR, Hill DK, Stokke E, Hatem R, Botty R El, Bièche I, Marangoni E, Bathen TF, Moestue SA. Metabolic response to everolimus in patient-derived triple negative breast cancer xenografts. *J Proteome Res.* 2017;16: 1868–1879. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00918
 183. National Cancer Institute. Metastatic HER2-Negative Breast Cancer. In: FDA Approval for Bevacizumab [Internet]. 2011 [cited 17 Dec 2017]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-bevacizumab#Anchor-Metastati-43353>
 184. National Cancer Institute. Drugs Approved to treat Breast Cancer [Internet]. 2017 [cited 15 Dec 2017]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast#2>
 185. Moestue SA, Dam CG, Gorad SS, Kristian A, Bofin A, Mælandsmo GM, Engebråten O, Gribbestad IS, Bjørkøy G. Metabolic biomarkers for response to PI3K inhibition in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013;15: R16. doi:10.1186/bcr3391
 186. Esmaeili M, Bathen TF, Engebråten O, Mælandsmo GM, Gribbestad IS, Moestue SA. Quantitative 31P HR-MAS MR spectroscopy for detection of response to PI3K/mTOR inhibition in breast cancer xenografts. *Magn Reson Med.* 2014;71: 1973–1981. doi:10.1002/mrm.24869
 187. Kim E, Tunset HM, Cebulla J, Vettukattil R, Helgesen H, Feuerherm AJ, Engebråten O, Mælandsmo GM, Johansen B, Moestue SA. Anti-vascular effects of the cytosolic phospholipase A2 inhibitor AVX235 in a patient-derived basal-like breast cancer model. *BMC Cancer.* 2016;16: 191. doi:10.1186/s12885-016-2225-1
 188. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALBc female mice. *Cancer Lett.* 1986;33: 215–223. doi:10.1016/0304-3835(86)90027-3
 189. Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academies Press; 1996. doi:10.17226/5140
 190. Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem.* 2008;372: 204–212. doi:10.1016/j.ab.2007.10.002
 191. Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TMD, Crockford D, Volynkin V V., Holmes E, Davies DB, Nicholson JK. Recursive segment-wise peak alignment of biological 1H NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Anal Chem.* 2009;81: 56–66. doi:10.1021/ac8011544
 192. Akter S, Ambra JD, Ray P. An Evaluation of PLS Based Complex Models: the Roles of Power Analysis, Predictive Relevance and Gof Index. *AMCIS2011.* 2011; 1–7. Available: http://aisel.aisnet.org/amcis2011_submissions/
 193. Chong IG, Jun CH. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemom Intell Lab Syst.* 2005;78: 103–112. doi:10.1016/j.chemolab.2004.12.011
 194. Nittoli AC, Costantini S, Sorice A, Capone F, Ciarcia R, Marzocco S, Budillon A, Severino L. Effects of α -zeaxenol on the metabolome of two breast cancer cell lines by 1H-NMR approach. *Metabolomics.* 2018;14: 33. doi:10.1007/s11306-018-1330-3
 195. Teng Q, Huang W, Collette TW, Ekman DR, Tan C. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics.* 2009;5: 199–208. doi:10.1007/s11306-008-0137-z

196. Choi JS, Yoon D, Koo JS, Kim S, Park VY, Kim E, Kim S, Kim MJ. Magnetic resonance metabolic profiling of estrogen receptor- positive breast cancer : correlation with currently used molecular markers. *Oncotarget*. 2017;8: 63405–63416. doi:10.18632/oncotarget.18822
197. Grinde MT, Skrbo N, Moestue SA, Rødland EA, Borgan E, Kristian A, Sitter B, Bathen TF, Børresen-Dale A-L, Mælandsmo GM, Engebraaten O, Sørli T, Marangoni E, Gribbestad IS. Interplay of choline metabolites and genes in patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res*. 2014;16: R5. doi:10.1186/bcr3597
198. Martineau E, Tea I, Loaëc G, Giraudeau P, Akoka S. Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401: 2133–2142. doi:10.1007/s00216-011-5310-y
199. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Anal Biochem*. 2010;404: 155–164. doi:10.1016/j.ab.2010.04.031
200. Fathi F, Brun A, Rott KH, Cobra PF, Tonelli M, Eghbalian HR, Caviedes-Vidal E, Karasov WH, Markley JL. NMR-based identification of metabolites in polar and non-polar extracts of avian liver. *Metabolites*. 2017;7: 61. doi:10.3390/metabo7040061
201. Haukaas TH, Moestue SA, Vettukattil R, Sitter B, Lamichhane S, Segura R, Giskeødegård GF, Bathen TF. Impact of Freezing Delay Time on Tissue Samples for Metabolomic Studies. *Front Oncol*. 2016;6: 17. doi:10.3389/fonc.2016.00017
202. Oostendorp M, Engelke UFH, Willemsen MAAP, Wevers RA. Diagnosing Inborn Errors of Lipid Metabolism with Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Clin Chem*. 2006;52: 1395–1405. doi:10.1373/clinchem.2006.069112
203. Mika A, Kaczynski Z, Stepnowski P, Kaczor M, Proczko-Stepaniak M, Kaska L, Sledzinski T. Potential Application of ¹H NMR for Routine Serum Lipidome Analysis -Evaluation of Effects of Bariatric Surgery. *Sci Rep*. 2017;7: 15530. doi:10.1038/s41598-017-15346-0
204. Sterin M, Cohen JS, Ringel I. Hormone sensitivity is reflected in the phospholipid profiles of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87: 1–11. doi:10.1023/B:BREA.0000041572.07837.ec
205. Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE, Goldberg KI, Gan R, Apiezon H. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities : Common Laboratory Solvents , Organics , and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*. 2010;29: 2176–2179. doi:10.1021/om100106e
206. Bridge PD, Sawilowsky SS. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: Comparative power of the t-test and Wilcoxon Rank-Sum test in small samples applied research. *J Clin Epidemiol*. 1999;52: 229–235. doi:10.1016/S0895-4356(98)00168-1
207. Le Boedec K. Sensitivity and specificity of normality tests and consequences on reference interval accuracy at small sample size: a computer-simulation study. *Vet Clin Pathol*. 2016;45: 648–656. doi:10.1111/vcp.12390
208. Ranstam J. Multiple p-values and Bonferroni correction. *Osteoarthritis Cartil*. 2016;24: 763–764. doi:10.1016/j.joca.2016.01.008
209. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2014;34: 502–508. doi:10.1111/opo.12131
210. Wang ZY, Loo TY, Shen JG, Wang N, Wang DM, Yang DP, Mo SL, Guan XY, Chen JP. LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131: 791–800. doi:10.1007/s10549-011-1466-6
211. Arora R, Schmitt D, Karanam B, Tan M, Yates C, Dean-Colomb W. Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers. *Oncotarget*. 2015;6: 662–678. doi:10.18632/oncotarget.2689
212. Icard P, Poulain L, Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2012;1825: 111–116. doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.007
213. Kim S, Kim DH, Jung W-H, Koo JS. Succinate dehydrogenase expression in breast cancer. *Springerplus*. 2013;2: 299. doi:10.1186/2193-1801-2-299
214. Tong W-H, Sourbier C, Kovtunovych G, Jeong SY, Vira M, Ghosh M, Romero VV, Sougrat R, Vaultont

- S, Viollet B, Kim Y-S, Lee S, Trepel J, Srinivasan R, Bratslavsky G, Yang Y, Linehan WM, Rouault TA. The Glycolytic Shift in Fumarate-Hydratase-Deficient Kidney Cancer Lowers AMPK Levels, Increases Anabolic Propensities and Lowers Cellular Iron Levels. *Cancer Cell*. 2011;20: 315–327. doi:10.1016/j.ccr.2011.07.018
215. Yang Y, Lane AN, Ricketts CJ, Sourbier C, Wei MH, Shuch B, Pike L, Wu M, Rouault TA, Boros LG, Fan TWM, Linehan WM. Metabolic Reprogramming for Producing Energy and Reducing Power in Fumarate Hydratase Null Cells from Hereditary Leiomyomatosis Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2013;8: e72179. doi:10.1371/journal.pone.0072179
 216. Lu X, Bennet B, Mu E, Rabinowitz J, Kang Y. Metabolomic changes accompanying transformation and acquisition of metastatic potential in a syngeneic mouse mammary tumor model. *J Biol Chem*. 2010;285: 9317–9321. doi:10.1074/jbc.C110.104448
 217. Simões R V., Serganova IS, Kruchevsky N, Leftin A, Shestov AA, Thaler HT, Sukenick G, Locasale JW, Blasberg RG, Koutcher JA, Ackerstaff E. Metabolic Plasticity of Metastatic Breast Cancer Cells: Adaptation to Changes in the Microenvironment. *Neoplasia*. 2015;17: 671–684. doi:10.1016/j.neo.2015.08.005
 218. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8: 851–864. doi:10.1038/nrc2501
 219. Ananieva E. Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response. *World J Biol Chem*. 2015;6: 281–289. doi:10.4331/wjbc.v6.i4.281
 220. Pollari S, Käkönen SM, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, Guise T, Nees M, Kallioniemi O. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125: 421–430. doi:10.1007/s10549-010-0848-5
 221. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo H, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun Z, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, ... Sabatini DM. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011;476: 346–350. doi:10.1038/nature10350
 222. Yin K. Positive correlation between expression level of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase and breast cancer grade. *Onco Targets Ther*. 2015;8: 1069–1074. doi:10.2147/OTT.S82433
 223. Zhang L, Han J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486: 224–231. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.101
 224. Ko YH, Lin Z, Flomenberg N, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE. Glutamine fuels a vicious cycle of autophagy in the tumor stroma and oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells: Implications for preventing chemotherapy resistance. *Cancer Biol Ther*. 2011;12: 1085–1097. doi:10.4161/cbt.12.12.18671
 225. Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: Where to go? *Purinergic Signal*. 2013;9: 145–165. doi:10.1007/s11302-012-9349-9
 226. Bahreyni A, Samani SS, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, Khazaei M, Ryzhikov M, Parizadeh MR, Avan A, Hassanian SM. Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233: 1836–1843. doi:10.1002/jcp.25944
 227. Lu J, Pierron A, Ravid K. An Adenosine Analogue , IB-MECA , Down-Regulates Estrogen Receptor alpha and Suppresses Human Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res*. 2003;63: 6413–6423.
 228. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER α mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2009;21: 977–981. doi:10.3892/or_00000311
 229. Yan R, Wan L, Pizzorno G, Cao D. Uridine phosphorylase in breast cancer: a new prognostic factor? *Front Biosci*. 2006;11: 2759–2766.
 230. Kanzaki A, Takebayashi Y, Bando H, Eliason JF, Watanabe SI, Miyashita H, Fukumoto M, Toi M, Uchida T. Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2002;97: 631–635. doi:10.1002/ijc.10105
 231. Glunde K, Shah T, Winnard PT, Raman V, Takagi T, Vesuna F, Artemov D, Bhujwalla ZM. Hypoxia Regulates Choline Kinase Expression through Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling in a Human Prostate Cancer Model. *Cancer Res*. 2008;68: 172–180. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2678

232. Righi V, Schenetti L, Maiorana A, Libertini E, Bettelli S, Bonetti LR, Mucci A. Assessment of freezing effects and diagnostic potential of BioBank healthy and neoplastic breast tissues through HR-MAS NMR spectroscopy. *Metabolomics*. 2015;11: 487–498. doi:10.1007/s11306-014-0709-z
233. Dória ML, Cotrim Z, MacEdo B, Simões C, Domingues P, Helguero L, Domingues MR. Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133: 635–648. doi:10.1007/s10549-011-1823-5
234. Benjamin DI, Cozzo A, Ji X, Roberts LS, Louie SM, Mulvihill MM, Luo K, Nomura DK. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110: 14912–14917. doi:10.1073/pnas.1310894110
235. Staubach S, Hanisch FG. Lipid rafts: Signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8: 263–277. doi:10.1586/epr.11.2
236. Badana A, Chintala M, Varikuti G, Pudi N, Kumari S, Kappala VR, Malla RR. Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer*. 2016;19: 372–384. doi:10.4048/jbc.2016.19.4.372
237. Glaser PE, Gross RW. Plasmenylethanolamine Facilitates Rapid Membrane Fusion: A Stopped-Flow Kinetic Investigation Correlating the Propensity of a Major Plasma Membrane Constituent To Adopt an HII Phase with Its Ability To Promote Membrane Fusion. *Biochemistry*. 1994;33: 5805–5812. doi:10.1021/bi00185a019
238. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res*. 2002;62: 6312–6317.
239. Moro K, Kawaguchi T, Tsuchida J, Gabriel E, Qi Q, Yan L, Wakai T, Takabe K, Nagahashi M. Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget*. 2018;9: 19874–19890. doi:10.18632/oncotarget.24903
240. Loo JM, Scherl A, Nguyen A, Man FY, Weinberg E, Zeng Z, Saltz L, Paty PB, Tavazoie SF. Extracellular Metabolic Energetics Can Promote Cancer Progression. *Cell*. 2016;160: 393–406. doi:10.1016/j.cell.2014.12.018.Extracellular
241. Zarghami N, Giai M, Yu H, Roagna R, Ponzone R, Katsaros D, Sismondi P, Diamandis EP. Creatine kinase BB isoenzyme levels in tumour cytosols and survival of breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1996;73: 386–390. doi:10.1038/bjc.1996.66
242. Choi JS, Baek HM, Kim S, Kim MJ, Youk JH, Moon HJ, Kim EK, Han KH, Kim D hyun, Kim S Il, Koo JS. HR-MAS MR Spectroscopy of Breast Cancer Tissue Obtained with Core Needle Biopsy: Correlation with Prognostic Factors. *PLoS One*. 2012;7: e51712. doi:10.1371/journal.pone.0051712
243. Gillaspay GE. The cellular language of myo-inositol signaling. *New Phytol*. 2011;192: 823–839. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03939.x
244. Strange K, Emma F, Paredes A, Morrison R. Osmoregulatory changes in Myo-inositol content and Na⁺/Myo-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia*. 1994;12: 35–43. doi:10.1002/glia.440120105
245. Maria RM, Alteí WF, Selistre-de-Araujo HS, Colnago LA. Impact of chemotherapy on metabolic reprogramming: Characterization of the metabolic profile of breast cancer MDA-MB-231 cells using ¹H HR-MAS NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;146: 324–328. doi:10.1016/j.jpba.2017.08.038
246. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Lisanti MP, Sotgia F. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: Stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells. *Cell Cycle*. 2012;11: 3956–3963. doi:10.4161/cc.22136
247. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol*. 2003;163: 1801–1815. doi:10.1016/S0002-9440(10)63540-7
248. Dhakal HP, Naume B, Synnestvedt M, Borgen E, Kaaresen R, Schlichting E, Wiedswang G, Bassarova A, Giercksky KE, Nesland JM. Vascularization in primary breast carcinomas: Its prognostic significance and relationship with tumor cell dissemination. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 2341–2350. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4214
249. Sormendi S, Wielockx B. Hypoxia pathway proteins as central mediators of metabolism in the tumor cells and their microenvironment. *Front Immunol*. 2018;9: 40. doi:10.3389/fimmu.2018.00040

250. Laurenti G, Tennant DA. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? *Biochem Soc Trans.* 2016;44: 1111–1116. doi:10.1042/BST20160099
251. Buchsbaum RJ, Oh SY. Breast cancer-associated fibroblasts: Where we are and where we need to go. *Cancers (Basel).* 2016;8: 19. doi:10.3390/cancers8020019
252. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Milliman JN, Chiavarina B, Migneco G, Witkiewicz AK, Martinez-Cantarin MP, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP, Sotgia F. Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: Implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle.* 2010;9: 2423–2433. doi:10.4161/cc.9.12.12048
253. Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Flomenberg N, Tsigiris A, Howell A, Martinez-outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: Evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. *Cell Cycle.* 2010;9: 2412–2422. doi:10.4161/cc.9.12.11989
254. Rattigan YI, Patel BB, Ackerstaff E, Sukenick G, Koutcher JA, Glod JW, Banerjee D. Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Exp Cell Res.* 2012;318: 326–335. doi:10.1016/j.yexcr.2011.11.014
255. Mu X, Shi W, Xu Y, Xu C, Zhao T, Geng B, Yang J, Pan J, Hu S, Zhang C, Zhang J, Wang C, Shen J, Che Y, Liu Z, Lv Y, Wen H, You Q. Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Cycle.* 2018;17: 428–438. doi:10.1080/15384101.2018.1444305
256. Unver N, Delgado O, Zeleke K, Cumpian A, Tang X, Caetano MS, Wang H, Katayama H, Yu H, Szabo E, Wistuba II, Moghaddam SJ, Hanash SM, Ostrin EJ. Reduced IL-6 levels and tumor-associated phospho-STAT3 are associated with reduced tumor development in a mouse model of lung cancer chemoprevention with myo- inositol. *Int J Cancer.* 2018;142: 1405–1417. doi:10.1002/ijc.31152
257. Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, Pearce EJ, Driggers EM, Artyomov MN. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015;42: 419–430. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005
258. Zhang X, Lu H, Wang Y, Liu C, Zhu W, Zheng S, Wan F. Taurine induces the apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria. *Int J Mol Med.* 2015;35: 218–226. doi:10.3892/ijmm.2014.2002
259. El Agouza IM, Eissa SS, El Houseini MM, El-Nashar DE, Abd El Hameed OM. Taurine: A novel tumor marker for enhanced detection of breast cancer among female patients. *Angiogenesis.* 2011;14: 321–330. doi:10.1007/s10456-011-9215-3
260. Shennan DB, Thomson J, Gow IF. Osmoregulation of taurine efflux from cultured human breast cancer cells: Comparison with volume activated Cl⁻ efflux and regulation by extracellular ATP. *Cell Physiol Biochem.* 2006;18: 113–122. doi:10.1159/000095178
261. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21: 1001–1016. doi:10.1080/14728222.2017.1381087
262. Mohammadzadeh F, Mosayebi G, Montazeri V, Darabi M, Fayezi S, Shaaker M, Rahmati M, Baradaran B, Mehdizadeh A, Darabi M. Fatty acid composition of tissue cultured breast carcinoma and the effect of stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition. *J Breast Cancer.* 2014;17: 136–142. doi:10.4048/jbc.2014.17.2.136
263. Gimeno RE. Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18: 271–276. doi:10.1097/MOL.0b013e3281338558
264. Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. Saturated Fatty Acid-induced Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2003;278: 31861–31870. doi:10.1074/jbc.M300190200
265. Brosnan ME, MacMillan L, Stevens JR, Brosnan JT. Division of labour: how does folate metabolism partition between one-carbon metabolism and amino acid oxidation? *Biochem J.* 2015;472: 135–146. doi:10.1042/BJ20150837
266. Meiser J, Schuster A, Pietzke M, Voorde J Vande, Athineos D, Oizel K, Burgos-Barragan G, Wit N,

- Dhayade S, Morton JP, Dornier E, Sumpton D, Mackay GM, Blyth K, Patel KJ, Niclou SP, Vazquez A. Increased formate overflow is a hallmark of oxidative cancer. *Nat Commun.* 2018;9: 1368. doi:10.1038/s41467-018-03777-w
267. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 2017;38: 119–133. doi:10.1093/carcin/bgw127
 268. Lee J, Hong BS, Ryu HS, Lee HB, Lee M, Park IA, Kim J, Han W, Noh DY, Moon HG. Transition into inflammatory cancer-associated adipocytes in breast cancer microenvironment requires microRNA regulatory mechanism. *PLoS One.* 2017;12: e0174126. doi:10.1371/journal.pone.0174126
 269. Krall AS, Xu S, Graeber TG, Braas D, Christofk HR. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat Commun.* 2016;7: 1–13. doi:10.1038/ncomms11457
 270. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell.* Elsevier Inc.; 2017;168: 613–628. doi:10.1016/j.cell.2017.01.018